



KAMILA ELLEN SOUZA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA E DE
METABÓLITOS EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO EM
Eucalyptus spp.**

**Lavras – MG
2019**

KAMILA ELLEN SOUZA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA E DE METABÓLITOS EM
RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO EM *Eucalyptus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Lavras – MG

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Kamila Ellen Souza de.

Análise comparativa do transcriptoma e de metabólitos em
resposta ao déficit hídrico em *Eucalyptus* spp. / Kamila Ellen Souza
de Oliveira. - 2019.

153 p. : il.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Transcriptoma. 2. Metabolismo. 3. Déficit hídrico. I. Paiva,
Luciano Vilela. II. Título.

KAMILA ELLEN SOUZA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA E DE METABÓLITOS EM
RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO EM *Eucalyptus* spp.**

**COMPARATIVE ANALYSIS OF TRANSCRIPTOME AND METABOLITES IN
RESPONSE TO WATER DEFICIT IN *Eucalyptus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de julho de 2019.

Prof. Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori (UFLA)

Dr. João Paulo Pennacchi (UFLA)

Prof. Alan Carvalho Andrade, PhD (EMBRAPA)

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Orientador

LAVRAS – MG

2019

*Ao meu vovô Joaquim (em memória), que
partiu antes que eu pudesse me despedir
e dizer a honra que foi ser sua neta.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde e coragem para buscar meus sonhos, por me dar a oportunidade de viver próxima de pessoas maravilhosas e por me amparar e proteger em cada dificuldade.

Aos meus pais, Marilene e Eliton, por me darem a vida, por sacrificarem tantos desejos seus para atender os meus e por acreditarem em meu potencial, até quando eu mesma não acreditava. Obrigada por ouvirem minhas reclamações e aguentarem minhas lágrimas quando eu pensava que nada ia dar certo. Obrigada por compreenderem as vezes que não pude ir para casa, mesmo que essa fosse minha maior vontade. Obrigada por comemorarem minhas vitórias e acreditarem nos meus sonhos, até mesmo mais que eu. Sem vocês eu não teria conseguido.

Aos meus familiares por todo apoio, ajuda e ensinamentos compartilhados comigo todos esses anos. Obrigada por lembrarem de mim quando eu estava longe, por sempre arrumarem um tempo para me ver quando eu ia para casa e por transmitirem tanto carinho sempre que conversavam comigo.

Ao Gabriel, que mesmo tão novo, foi capaz de me trazer alegria em cada momento que passamos juntos e em cada ligação de vídeo. Aos meus outros irmãos, Vinícius, João Vítor e João Guilherme, por me fazerem acreditar que ainda existem muitas pessoas boas nesse mundo.

Ao Thiago, por ser meu companheiro em dias bons e ruins, pela paciência, pelo amor e por toda a ajuda ao longo desses meses. Obrigada por aguentar minhas mudanças de humor e minhas paranoias e por me explicar coisas que eu não sabia, mesmo não gostando de fazer isso. Obrigada por não reclamar, por estar sempre ao meu lado e por todo tempo dedicado em me ajudar nesse trabalho.

Aos meus verdadeiros amigos, por acompanharem meus sonhos pessoais e profissionais e por tantas memórias de alegrias.

Aos meus primeiros orientadores, Andréa e Leonardo, por toda sabedoria, experiência e paciência repassada a mim, de tão boa vontade.

Ao Luciano, por aceitar me orientar sem nem me conhecer, por me dar a liberdade de sugerir projetos e por permitir que eu trabalhasse com algo que me deu imensa satisfação. Obrigada pelas explicações e ensinamentos e por não criticar meus bilhetes na sua porta.

Aos amigos do Laboratório Central de Biologia Molecular, pela companhia diária, pelas risadas, pelos ensinamentos e pela ajuda nos experimentos. Vocês tornaram esses dois anos de mestrado mais divertidos e mais fáceis. Obrigada pelas histórias, pelas festas, pelas reclamações em conjunto e por entenderem cada vez que precisei chorar no laboratório. Em especial, ao

Thiago e ao Farley, por todo trabalho dedicado neste projeto, pela companhia na estufa, às 5 horas da manhã, nos fins de semana e em dias de chuva; e aos técnicos, por atenderem meus pedidos desesperados e de última hora.

À Rossilvânia e ao Fabrício, pela paciência e por todas as palavras de sabedoria compartilhadas comigo ao longo desse processo de amadurecimento.

Aos professores Paulo e Elisa, pela boa vontade em tirar minhas dúvidas, pelos ensinamentos em Fisiologia e por perguntarem como iam os experimentos, mesmo quando não tinham obrigação de fazer isso.

À Thaís, pela disponibilidade em me ajudar nas análises bioquímicas, mesmo que isso significasse perder os fins de semana, às vésperas da defesa.

Ao Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, que mesmo me assustando às vezes, foi um local de muito aprendizado e crescimento profissional, que me levaram a ter certeza do que realmente gosto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e concessão da bolsa.

Meus eternos agradecimentos, vocês levarão sempre o melhor de mim!

RESUMO GERAL

Ao longo das décadas vários estudos moleculares e fisiológicos já demonstraram que as respostas ao déficit hídrico dependem de uma rede integrada de regulação, que envolve todos os aspectos das plantas. Essas repostas vegetais variam de acordo com a severidade do estresse, do genótipo e da fase de desenvolvimento da planta e ajudam a reduzir os efeitos deletérios da falta de água e conferir tolerância à esta condição. Como estas diferenças podem ser detectadas em espécies próximas, este trabalho teve como objetivo obter uma visão multidisciplinar das respostas geradas por dois clones de eucalipto em condições de baixa disponibilidade de água, com enfoque nos mecanismos transcricionais, bioquímicos e fisiológicos ativados nessa situação. Os clones analisados foram VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis*) e VM05 (*E. urophylla*), selecionados por apresentam respostas contrastantes sob déficit hídrico. Comparações em nível transcricional, com dados de RNA-seq, revelaram genes diferencialmente expressos e fatores de transcrição responsivos ao déficit hídrico nos dois materiais genéticos analisados. A expressão relativa de genes envolvidos na biossíntese, transporte e degradação de ácido abscísico (ABA) foi modulada em resposta aos tratamentos impostos, principalmente em raízes e tecidos vasculares. Padrão semelhante foi detectado em rotas do metabolismo de carbono, onde a atividade de enzimas específicas foi alterada em situações de estresse severo, com diferença entre os clones VM01 e VM05. Estudos mais específicos de genes das famílias NCED, DREB e MET, associadas à regulação sob déficit hídrico em diversas espécies, revelaram que existem vários genes em eucalipto com potencial de uso em estudos futuros sobre escassez de água. Análises da expressão gênica, via RT-qPCR, de genes destas famílias revelaram que os clones adotam estratégias diferentes para sobreviver em condições limitantes, sendo que o VM05 parece estar sob controle de modificações epigenéticas. Para ajudar a elucidar esta ideia, metabólitos sinalizadores do déficit hídrico foram quantificados em tecidos foliares dos dois clones. Diferenças foram detectadas no metabolismo de carboidratos (amido, açúcares redutores e sacarose) e no conteúdo de ABA, sugerindo que o clone VM01 apresenta respostas mais rápidas de defesa à redução de água, fato que reflete em uma maior tolerância destas plantas ao déficit hídrico. De maneira geral, as análises integradas e comparativas desses clones permitiram um maior entendimento do mecanismo regulatório do déficit hídrico em eucalipto, com a geração de dados que garantem estudos futuros e auxiliam os programas de melhoramento genético na seleção de genótipos tolerantes ao estresse.

Palavras-chave: Transcriptoma. Metabolismo. Déficit hídrico.

ABSTRACT

Over the decades, several molecular and physiological studies have shown that responses to water deficit depend on an integrated regulatory network, which involves all aspects of plants. These plant responses vary according to the severity of the plant's stress, genotype and developmental phase and help to reduce the deleterious effects of lack of water and confer tolerance to this condition. As these differences can be detected in nearby species, this work aimed to obtain a multidisciplinary view of the responses generated by two eucalyptus clones under conditions of low water availability, focusing on the transcriptional, biochemical and physiological mechanisms activated in this situation. The clones analyzed were VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis*) and VM05 (*E. urophylla*), selected by presenting contrasting responses under water deficit. Comparisons at the transcriptional level with RNA-seq data revealed differentially expressed genes and transcriptional factors responsive to water deficit in the two genetic materials analyzed. The relative expression of genes involved in biosynthesis, transport and degradation of abscisic acid (ABA) was modulated in response to the treatments imposed, mainly in vascular roots and tissues. Similar pattern was detected in routes of carbon metabolism, where the activity of specific enzymes was altered in situations of severe stress, with difference between clones VM01 and VM05. More specific studies of genes from the NCED, DREB and MET families, associated with regulation of water deficit in several species, revealed that there are several genes in eucalyptus with potential use in future studies on water scarcity. Gene expression analysis by RT-qPCR of genes from these families revealed that clones adopt different strategies to survive under limiting conditions, and VM05 appears to be under control of epigenetic modifications. To help elucidate this idea, water deficit signaling metabolites were quantified in leaf tissues of the two clones. Differences were detected in the metabolism of carbohydrates (starch, reducing sugars and sucrose) and ABA content, suggesting that clone VM01 presents faster defense responses to water reduction, a fact that reflects in a higher tolerance of these plants to the water deficit. In general, the integrated and comparative analyzes of these clones allowed for a better understanding of the regulatory mechanism of water deficit in eucalyptus, with the generation of data that guarantee future studies and help the breeding programs in the selection of genotypes tolerant to stress.

Keywords: Transcriptome. Metabolism. Water deficit.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Eucalipto.....	15
2.1.1 Importância econômica	15
2.1.2 Características genômicas e fisiológicas.....	17
2.1.3 Consumo de água e limitantes da produção	17
2.1.4 Clones VM01 e VM05	19
2.2 Déficit hídrico.....	20
2.2.1 Impactos e projeções futuras	20
2.2.2 Estratégias de tolerância ao déficit hídrico	21
2.2.3 Dinâmica de carboidratos	24
2.2.4 Alterações moleculares em plantas sob déficit hídrico	26
2.2.5 Sinalização induzida pelo ácido abscísico	26
2.2.6 Avaliação das alterações moleculares	29
REFERÊNCIAS	31
SEGUNDA PARTE	42
ARTIGO 1 – PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DE <i>Eucalyptus</i> spp. EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO	43
RESUMO	44
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS	47
Obtenção das plântulas <i>in vitro</i>	47
Aclimatização das plantas em casa de vegetação	48
Estabelecimento do estresse	49
Análises e coleta do material vegetal	49
Extração de RNA total	51
Sequenciamento do RNA.....	51
Processamento dos dados	52
Análise de genes diferencialmente expressos (GDE's).....	52
Análises de enriquecimento funcional.....	53
RESULTADOS	54
Aclimatização das plântulas obtidas <i>in vitro</i>	54
Estabelecimento do estresse e coleta de dados.....	55
Análises globais do sequenciamento	58
Genes diferencialmente expressos (GDE's)	63
Rede de correlação dos fatores de transcrição	64
Distribuição geral dos genes.....	68
Dinâmica e distribuição de ABA	71
Rotas metabólicas da fotossíntese.....	75
DISCUSSÃO	78
Estresse e potencial hídrico	78
Genes diferencialmente expressos e fatores de transcrição.....	79
Agrupamento de genes associadas ao déficit hídrico	81
Genes reguladores do ABA	83
Rotas metabólicas	84
CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88

ARTIGO 2 – PERFIL DA EXPRESSÃO RELATIVA DE GENES DAS FAMÍLIAS NCED, DREB E MET EM CLONES CONTRASTANTES DE *Eucalyptus* spp. SOB DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS 96

RESUMO	97
ABSTRACT	98
INTRODUÇÃO	99
MATERIAL E MÉTODOS	101
Preparo do material vegetal e imposição do déficit hídrico	101
Perfil de expressão das famílias NCED, DREB e MET	101
Extração de RNA total	101
Preparo das amostras de RNA	102
Análise da expressão gênica via RT-qPCR	102
Análise dos dados de qPCR	103
RESULTADOS	104
Estabelecimento do déficit hídrico	104
Expressão relativa das famílias NCED, DREB e MET	106
Quantificação da expressão dos genes <i>EgrNCED3</i> , <i>EgrDREB2</i> e <i>EgrMET1</i>	111
DISCUSSÃO	114
Morfologia e déficit hídrico	114
Expressão gênica	115
CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS	120

ARTIGO 3: DISTRIBUIÇÃO DE METABÓLITOS EM TECIDOS FOLIARES DE EUCALIPTO SUBMETIDO AO DÉFICIT HÍDRICO 126

RESUMO	127
ABSTRACT	128
INTRODUÇÃO	129
MATERIAL E MÉTODOS	131
Estabelecimento do déficit hídrico	131
Extração de macromoléculas	131
Extração e quantificação de amido	132
Quantificação de açúcares redutores	132
Extração e quantificação de sacarose	132
Extração, purificação e quantificação de ABA	132
Análises estatísticas	133
RESULTADOS	134
Quantificação de amido	134
Quantificação de açúcares redutores	135
Quantificação de sacarose	137
Condutância estomática	140
Quantificação de ácido abscísico	141
DISCUSSÃO	142
Carboidratos	142
Ácido abscísico	146
CONCLUSÃO	149
REFERÊNCIAS	149

PRIMEIRA PARTE

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

No setor produtivo, a água é o principal fator ambiental que limita o desenvolvimento das plantas. No atual cenário das mudanças climáticas, reduções na frequência de precipitação e a ocorrência de secas severas estão entre os principais problemas do setor produtivo, tanto agrícola quanto florestal (FANG; XIONG, 2015). Eventos de escassez de água já geraram perdas de mais de 70% das plantações comerciais pelo mundo nos últimos 10 anos e tendem a ser ainda maiores, dada a necessidade de expansão das áreas produtivas para regiões com restrições hídricas severas (FAO, 2016; OECD, 2019). Globalmente, 80% das áreas de cultivo estão em áreas de sequeiro (ZARGAR et al., 2017); no Brasil, mais de 60% dessas áreas estão em regiões sujeitas à algum grau de déficit hídrico (CEMADEN, 2018).

No setor florestal brasileiro, o eucalipto é a espécie que será mais afetada pela restrição hídrica, uma vez que é a árvore mais plantada no país (IBÁ, 2019). As espécies do gênero *Eucalyptus* são plantas lenhosas tropicais/subtropicais pertencentes à família Myrtaceae (YAN et al., 2019). Ao todo, são mais de 700 espécies e híbridos naturais conhecidos, capazes de fornecerem matéria-prima e produtos para a construção civil, para os setores industriais e para as indústrias química e farmacêutica (DOBROWOLSKA et al., 2017). No Brasil, a maioria das plantações comerciais deriva de híbridos e clones melhorados, fato que garante ao país ser destaque produtivo à nível mundial (PICHELLI; SOARES, 2019). Entretanto, informações sobre quais mecanismos fisiológicos e genéticos cada um deles apresenta frente às adversidades ambientais ainda são escassos. O conhecimento desses parâmetros é essencial para a sustentabilidade dos novos plantios, uma vez que a expansão das florestas plantadas é em direção a regiões mais secas (HODECKER et al., 2018).

Para superar ou reduzir as consequências da escassez de água é importante que os genótipos recomendados para cultivo sejam tolerantes à essa condição, a fim de maximizar a produtividade e minimizar as perdas (WU et al., 2017). Experimentos com espécies diferentes de eucalipto em regime hídrico reduzido já demonstraram que as respostas à esta condição variam muito durante o período sem água (BERENGUER et al, 2018; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2016). Para sobreviver em tais condições, as plantas desenvolveram uma rede complexa de estratégias adaptativas, que vão desde a percepção do sinal até a ativação de rotas específicas de resposta e envolvem habilidades genéticas, bioquímicas e fisiológicas (JAIN et al., 2019; KAUR; ASTHIR, 2017). A elucidação dessas respostas é de extrema importância pois permite entender como é o mecanismo de tolerância ao estresse desenvolvido por algumas espécies (AKPINAR; BUDAK; STUART, 2013).

Existem vários tipos de respostas conhecidas ao déficit hídrico, que em termos fisiológicos, refere-se à situação em que a quantidade de água disponível no solo às plantas é menor do que a quantidade necessária para a expressão do seu potencial fisiológico (BERGAMASCHI, 1992). Nesse ponto, a transpiração da planta passa a ser afetada (TAIZ et al., 2017). O déficit hídrico leva à indução de genes de proteção celular e os produtos codificados por esses genes podem promover respostas que variam desde a percepção do estresse até a ativação de rotas adaptativas (SEKI et al., 2003). Outras características também são alteradas, como anatomia da raiz e das folhas, ajuste osmótico, potencial hídrico, conteúdo de ácido abscísico (ABA) e estabilidade da membrana celular (FILKELSTEIN, 2013; HAMAKRISHNA; GILL, 2018; VALDÉS et al., 2013; ZARGAR et al., 2017).

Entre as respostas moleculares ao déficit hídrico, estão a ativação de vias de sinalização e fatores de transcrição responsivos ao estresse e à indução da expressão de genes que participam de rotas de defesa, como biossíntese de ABA e osmoprotetores e enzimas antioxidantes (ESTRADA-MELO et al., 2015; KIM; KANG; KIM, 2004; SAH; REDDY; LI, 2016; ZHU et al., 2016). A identificação dessas alterações podem ser feitas vias análises do transcriptoma ou das variações na expressão gênica e permitem a identificação de novos genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico ou a validação de genes já conhecidos na espécie de interesse (MARCOLINO-GOMES et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; SEKI et al., 2003).

Entre as resposta fisiológicas, o metabolismo de carboidratos e a concentração de ABA estão dentre os pontos mais afetados pelo déficit hídrico. Alterações na dinâmica de carboidratos são reflexo direto das reduções na taxa de assimilação de carbono pela fotossíntese (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Como consequência da baixa disponibilidade de água, as plantas podem armazenar carbono na forma de amido ou degradá-lo em açúcares solúveis, dependendo da severidade e duração do estresse e da espécie vegetal (THALMANN; SANTELIA, 2017). Os açúcares, além de servirem como fonte de energia metabólica, são importantes também para a regulação osmótica celular, a manutenção do transporte no floema e a sinalização dos eventos de estresse (HASIDEBER et al., 2015; SAVAGE et al., 2016). O ABA também regula as respostas ao déficit hídrico. Este fitormônio é considerado um sinalizador do estresse, responsável pelos eventos que levam ao fechamento estomático e a indução de genes e fatores de transcrição responsivos à perda de água (CUTLER et al., 2010).

Enquanto a maioria das plantas são sensíveis à desidratação e sofrem danos severos sob déficit hídrico, outras plantas apresentam adaptações que garantem sua sobrevivência em ambientes limitantes. Como estas plantas apresentam mudanças específicas na expressão gênica

e no metabolismo em condições de estresse, formulou-se a hipótese de que essas diferenças também são detectáveis em plantas da mesma família.

Para testar esta hipótese, dois clones contrastantes de eucalipto foram estudados, o clone VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis*) e o clone VM05 (*E. urophylla*). O objetivo geral foi avaliar propriedades metabólicas e moleculares, reconhecidas como importantes para a tolerância ao déficit hídrico, e elucidar os mecanismos que atuam nas condições de baixa disponibilidade hídrica para esses dois materiais genéticos. Com isso espera-se obter respostas que auxiliem na seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico, via interação de fatores genéticos e fisiológicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Eucalipto

2.1.1 Importância econômica

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e engloba aproximadamente 700 espécies arbóreas, divididas entre subespécies, variedades e híbridos naturais (GRATTAPAGLIA; KISRT, 2008). A maioria das espécies tem origem na Austrália, mas atualmente já foram introduzidas em diversos países do mundo e são encontradas em todas as regiões tropicais e subtropicais (GONÇALVES et al., 2013). O vasto cultivo é possível devido ao seu rápido crescimento e ampla adaptabilidade às condições ambientais e aos tipos de solo, além do elevado interesse em pesquisas e melhoramento, dada a importância comercial das espécies, que produzem muita biomassa e apresentam múltiplos usos da madeira, além da sua facilidade de hibridação (CORREDOIRA et al., 2015; GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008).

As espécies de eucalipto fornecem matéria-prima para as indústrias de combustível e papel, para setores da construção civil, para confecção de painéis de madeira e pisos laminados e para produção de carvão vegetal (DOBROWOLSKA et al., 2017). A grande diversidade das espécies contribui para suprir a demanda por produtos e árvores de reflorestamento, em um cenário global de redução das florestas nativas disponíveis, garantindo assim o desenvolvimento de uma economia de baixo carbono (IBÁ, 2018b). O aumento demográfico, o crescimento econômico e a expansão das políticas de bioenergia também contribuem para a constante busca do sucesso das plantações comerciais (HODECKER et al., 2018; LELU-WALTER et al., 2018). Além disso, as florestas plantadas de eucalipto contribuem para a conservação da biodiversidade, preservação do solo, ciclagem de nutrientes, regulação dos

recursos hídricos, redução da concentração dos gases de efeito estufa, polinização e controle do clima (BERTOLA, 2013; IBÁ, 2018a).

A indústria brasileira de árvores plantadas é reconhecida internacionalmente pela alta produtividade, manejo sustentável e sustentabilidade da cadeia produtiva. Em 2017, a silvicultura brasileira foi responsável pela produção de 35,7 m³/ha/ano de eucalipto, distribuídos em 7,84 milhões de hectares de árvores plantadas – valor equivalente a 6,1% do PIB industrial do país –, além de 5,8 milhões de hectares destinados às áreas de restauração e preservação. Os principais estados produtores são Minas Gerais, com 24% do plantio, São Paulo (17%) e Mato Grosso do Sul (15%). Os números são ainda mais impressionantes quando comparados com a segunda espécie florestal mais plantada no Brasil, o *Pinus* spp., que tem uma área de produção 12x menor que o eucalipto. Além disso, foram gerados R\$ 11,4 bilhões em tributos, US\$ 10,7 milhões em exportação, mais de 500 mil empregos diretos e subprodutos com potencial para serem usados nas indústrias farmacêutica, química, cosmética, têxtil e aeronáutica (IBÁ, 2019).

Em parâmetros mundiais, a área de florestas plantadas ocupa aproximadamente 300 milhões de hectares em todo o planeta (FAO, 2016), mas até 2050 serão necessários 250 milhões de hectares a mais de área de produção, com incremento nos rendimentos por hectare, para acompanhar o aumento da população e a crescente demanda por produtos florestais e bioenergia (DOBROWOLSKA et al., 2017; OECD, 2019). Esses fatores incentivam a expansão das florestas plantadas para áreas com restrições hídricas mais severas (HODECKER et al., 2018). Diversas espécies e híbridos apresentam potencial para atingir os objetivos de produção, entre eles a espécie *Eucalyptus globulus*, amplamente cultivada pelo mundo, devido à versatilidade, boa qualidade de fibra e rápido crescimento (PATT et al., 2006); a espécie *E. grandis*, importante em vários setores florestais e que apresenta alta plasticidade genética (MYBURG et al., 2014); o híbrido *E. urophylla* x *E. grandis*, que produz madeira de alta qualidade para celulose, papel, madeira e energia, possui boa capacidade de enraizamento e resistência à doenças (OUYANG et al., 2012); e o híbrido *E. camaldulensis* x *E. urophylla*, que tem boa qualidade da madeira e maior tolerância à seca, quando comparado com outras espécies do gênero (MARTINS et al., 2018).

O grande número de espécies melhoradas nos plantios atuais de eucalipto é devido aos investimentos contínuos em pesquisas para o melhoramento genético, o que, aliado a práticas de produção e ao desenvolvimento das técnicas de clonagem, garantem a otimização do uso das áreas de plantio (CIB, 2008). Pesquisas trabalham para a obtenção de mais clones e híbridos

que resultem em árvores mais resistentes a pragas e doenças, com maior taxa de crescimento, maior quantidade e qualidade de fibras e melhor adaptação à estresses abióticos.

2.1.2 Características genômicas e fisiológicas

Eucalyptus é um gênero com plantas diploides com o conjunto haploide de 11 cromossomos ($2n = 22$), que apresenta homologia entre seus genes com as espécies da família Myrtaceae (GRATTAPAGLIA et al., 2012). Devido ao avanço nas pesquisas no campo genômico e a publicação do genoma de *E. grandis* (MYBURG et al., 2014), espécies do gênero passaram a ser cruciais no progresso de estudos genéticos dessa família (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008). Considerado um gênero modelo em estudos genômicos, o estudo de *Eucalyptus* oferece principalmente suporte em outros estudos genéticos da mesma família (GRATTAPAGLIA et al., 2012).

Em termos fisiológicos, o eucalipto é classificado como planta C_3 , ou seja, o primeiro produto estável do processo de fixação de carbono na fotossíntese é um composto de três carbonos. Em condições de estresse como baixa disponibilidade de água e temperaturas elevadas, seu metabolismo é afetado e sofre alterações em vários níveis, como por exemplo, nas taxas de assimilação de CO_2 , o que reflete diretamente na síntese de carboidratos (TAIZ et al., 2017). No eucalipto, essa síntese sofre regulação enzimática, de acordo com a disponibilidade de substrato. Isso faz com que variações na taxa fotossintética coordenem o processo de síntese de carboidratos, o que reflete diretamente na exportação e armazenamento temporário desses compostos nas folhas. Esta dinâmica é influenciada também pelo genótipo e fase de desenvolvimento da planta e pelas condições do ambiente em que ele está cultivada (GRANDA; CAMARERO, 2017).

2.1.3 Consumo de água e limitantes da produção

Para garantir boas taxas de produtividade dos plantios de eucalipto, é necessário que os fatores que limitam o seu crescimento e desenvolvimento sejam controlados (BECHTOLD; FIELD, 2018). Dentre os fatores limitantes, como interferência de plantas daninhas (FAUSTINO et al., 2017), temperaturas extremas (FERNÁNDEZ; TRONCOSO; VAL.ENZUELA, 2015; NAVARRETE-CAMPOS et al., 2013), nutrição mineral (BATTIE-LACLAU et al., 2014), pragas (DIAS et al., 2018; JORDAN; POTTS; CLARKE, 2002; LOCH;

MATSUKI, 2010) e doenças (DJEUGAP et al., 2018), a baixa disponibilidade de água é o mais agravante (BERENGUER et al., 2018; FENSHAM et al., 2015).

A água é tida como o principal limitante da produção pois está envolvida em várias funções vegetais, como estrutura, crescimento, transporte e metabolismo. Sem a quantidade adequada de água, as células não conseguem manter a pressão de turgor, responsável pelos processos de expansão celular, abertura estomática e transporte de foto assimilados pelo floema (WU et al., 2017). Em tecidos lenhosos, essa redução pode ser ainda mais agravante, uma vez que o conteúdo de água pode variar entre 35% e 75% (BIANCHI; GERMINO; SILVA, 2016).

Por ser uma espécie de crescimento rápido e que produz muita biomassa, o eucalipto tem uma elevada taxa de consumo de água para manter seu crescimento e seus incrementos em madeira. Entretanto, em comparação com outras espécies, o eucalipto não consome mais água por unidade de biomassa produzida e até retém menos água que as matas nativas cujas árvores tem copas maiores (ANDRADE, 2019; CIB, 2008). Os valores diários de consumo de água/árvore variam entre 1,2 e 46,2 litros, de acordo com a espécie e a fase de desenvolvimento, e as taxas de transpiração oscilam entre 0,2 e 7,7 mm/dia, dependendo do espaçamento (ANDRADE, 2019). Além disso, o eucalipto é muito eficiente no uso da água: um litro de água absorvido é capaz de produzir até 3 gramas de madeira (PICHELLI; SOARES, 2019). Em épocas secas, a estratégia utilizado por essa árvore é reduzir o consumo de água através da queda de algumas folhas (FLORENCE, 2004).

A quantidade de água requerida por cada espécie depende da fase de crescimento em que ela se encontra e das condições ambientais. Plantas próximas aos 3 anos de idade, período de maior acúmulo de biomassa, têm maior demanda de água, que é suprida, quase que exclusivamente, pelas chuvas, uma vez que as raízes ainda não atingiram camadas mais profundas do solo (ANDRADE, 2019). Condições ambientais críticas, como baixas temperaturas, seca e alagamento também alteram as necessidades hídricas, podendo causar estagnação do crescimento ou mudanças no padrão de formação do lenho (NAVARRETE-CAMPOS et al., 2013; TAIZ et al., 2017).

Entre as espécies mais plantadas no Brasil, estão: *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. dunnii* e *E. benthamii* e híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (PICHELLI; SOARES, 2019). Cada uma dessas espécies tem características especiais da madeira, são adaptadas à determinados climas e solos e têm requerimentos hídricos diferentes (GONÇALVES et al., 2013). Em regiões que sofrem com secas prolongadas, o plantio de *E. grandis* x *E. urophylla* predomina, além de clones de domínio público, como AEC 0144 (*E. urophylla*), COP 1277 (*E. grandis* x *E. camaldulensis*) e VM01 (*E. urophylla* x *E.*

camaldulensis). Em contrapartida, *E. grandis*, uma das espécies mais plantadas no mundo, se adapta melhor em solos úmidos e bem drenados (BATTIE-LACLAU et al., 2014). A tolerância das espécies à perda de água vai depender da habilidade do citoplasma de cada espécie em tolerar a dessecação (BIANCHI; GERMINO; SILVA, 2016).

2.1.4 Clones VM01 e VM05

O híbrido VM01 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) reúne características de interesse de duas espécies. *E. urophylla* é muito cultivada no Brasil devido ao seu rápido desenvolvimento e rendimento, além de ser uma espécie bem adaptada a regiões de climas tropicais e subtropicais úmidos e produzir madeira resistente e versátil, ou seja, com potencial de uso como matéria-prima para a produção de papel, celulose, painéis e carvão (FARIA et al., 2013; MOURA, 2004; SCANAVACA JÚNIOR; GARCIA, 2003). *E. camaldulensis* destaca-se por ser uma espécie que se adapta em zonas edáficas, com bom desenvolvimento em regiões de solos pobres e com estações prolongadas de seca, produzindo uma madeira densa e tortuosa, com potencial de uso para serraria, mourões e carvão (REVISTA DA MADEIRA, 2003). A junção de características das duas espécies, faz com que o híbrido *E. urophylla* x *E. camaldulensis* seja recomendado para plantio em áreas secas ou solos arenosos ou quando se deseja obter uma floresta energética, com produção de madeira para carvão e celulose; entretanto, apresenta redução na biomassa do tronco em casos de seca severa (BM REFLORESTAMENTO, 2014; GONÇALVES et al., 2013; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2013).

VM05 é um clone de *E. urophylla*, espécie que, apesar de ter uma boa produtividade, não está apta a produzir em situações de déficit hídrico severo ou onde ocorrem geadas. Seu cultivo ainda é intenso, pois apresenta alta taxa de crescimento, resistência à ferrugem e boa capacidade de regeneração por brotação, o que torna interessante seu uso em programas de melhoramento genético, principalmente hibridação, e reflorestamento (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2013; REVISTA DA MADEIRA, 2003; SCANAVACA JÚNIOR; GARCIA, 2003).

Em relação às características gerais, VM01 é um clone que pode atingir entre 30 e 60 m de altura, desenvolve raízes que podem atingir entre 1,5 e 2,5 m de profundidade no solo e tem capacidade de incremento anual de 44 m³.ha⁻¹.ano⁻¹ (SOUZA et al., 2017). VM05 tem um tronco predominantemente marrom, com copa aberta e folhas sem cerosidade e pode atingir até 50 m de altura nas regiões nativas e mais de 2,5 m de raiz pivotante (FLORENCE, 2004; MAPA, 2017). É comum que os híbridos apresentem maior plasticidade ambiental às ameaças

bióticas e abióticas, entretanto eles diferem na geração de respostas ao estresse dentro do mesmo gênero, indicando que existem estratégias diferentes de adaptação diferentes entre as espécies (BERENGUER et al., 2018; DASGUPTA; DHARANISHANTHI; 2017; FARIA et al., 2013; FERNANDES; CAIRO; NOVAES, 2015).

2.2 Déficit hídrico

2.2.1 Impactos e projeções futuras

Projeções da OECD (2010) indicam que a população mundial atingirá mais de nove bilhões de pessoas até 2050, o que exigirá uma intensificação no uso da terra através da agricultura e pecuária. Concomitante a isso, haverá um maior crescimento industrial e desenvolvimento das cidades, o que levará ao aumento das emissões de gases de efeito estufa, e um aumento das temperaturas médias, provocando ampliação na variabilidade das características climáticas de todo o planeta, onde secas prolongadas ocorrerão com maior frequência (OECD, 2019). A combinação desses fatores afetará diretamente a produção agrícola, principalmente nos países que são os maiores produtores mundiais, como Brasil, Estados Unidos, China e Índia (FANG; XIONG, 2015; TORQUEBIAU, 2015). A seca não só inflige pesadas perdas na produção agrícola, como também contribui para danos ecológicos, desertificação da terra e erosão do solo (IWMI, 2017). Todos esses fatores tornam a escassez de água um problema global de extrema urgência. É essencial que estratégias de mitigação sejam intensificadas, a fim de manter o equilíbrio global de produção.

Seca refere-se a um fenômeno meteorológico em que um período suficientemente longo de escassez de água resulta em lesão e limitações absolutas aos processos fisiológicos nas plantas (FANG; XIONG, 2015). Os prejuízos variam de acordo com o grau de intensidade da seca (severa ou moderada), que pode ser avaliado observando os valores de potencial hídrico em cada espécie e em cada situação (TAIZ et al., 2017). Esse termo é usado frequentemente para exemplificar situações de déficit hídrico, uma vez que os conceitos são similares (LAWLOR, 2012). Déficit hídrico é uma situação em que a quantidade de água disponível no solo às plantas é menor do que a quantidade necessária para a expressão do seu potencial fisiológico (BERGAMASCHI, 1992). Essa condição faz parte de um conceito maior, o estresse hídrico, que embora seja comumente utilizado para se referir a condições de baixa disponibilidade hídrica, faz referência a qualquer estresse causado por quantidades inadequadas de água, seja abaixo do ideal (desidratação) ou acima (alagamento).

A baixa disponibilidade de água pode ser consequência da escassez de água propriamente dita, mas também pode advir de outros fatores ambientais, como temperaturas elevadas, que aumentam a evapotranspiração das plantas, temperaturas extremamente baixas, que congelam a água, e salinidade dos solos, que altera o equilíbrio osmótico (BOHNERT; JENSEN, 1996; NAVARRETE-CAMPOS et al., 2013). No Brasil, eventos de seca ocorrem em todas as regiões do país (CEMADEN, 2018). Por estarem inter-relacionados, esses estresses induzem a ativação de genes de vias de sinalização e danos celulares semelhantes nas plantas. Entretanto, algumas respostas metabólicas e alguns genes são especificamente expressos em cada situação de estresse ou na combinação de uma ou mais situações, formando uma complexa rede de respostas (WU et al., 2017).

Todos os processos vegetais requerem água em quantidades adequadas para manterem o funcionamento celular correto. Restrições nessas quantidades afetam várias reações metabólicas, o transporte de íons, a assimilação de nutrientes, o desenvolvimento, a translocação de foto assimilados entre outros (ZARGAR et al., 2017). Em sistemas florestais, é difícil prever as consequências específicas da redução da disponibilidade de água e das demais mudanças ambientais, pois as árvores apresentam respostas específicas da espécie à essas condições (FAO, 2016). Além disso, poucos estudos examinaram o potencial de recuperação pós-seca dessas espécies (FENSHAM et al., 2015).

Entre as modificações mais comuns em espécies lenhosas sob estresse estão as alterações na partição de foto assimilados e as modificações no crescimento secundário. Nessas situações, a quebra dos carboidratos acumulados é ainda mais acentuada que em espécies arbóreas, para garantir a alocação do carbono e a manutenção dos processos vitais das plantas (RAMAKRISHNA; GILL, 2018). O lenho desenvolvido sob essas condições pode mostrar aumento da densidade de vasos e paredes celulares que produzem mais lignina do que celulose, o que melhora a função de transporte e retenção de água do xilema (TAIZ et al., 2017).

2.2.2 Estratégias de tolerância ao déficit hídrico

Como as plantas são sésseis e não conseguem alterar a disponibilidade de água no solo, elas desenvolveram uma série de mecanismos para sobreviver ao estresse por déficit hídrico (HE; HE; DING, 2018). Embora essenciais, a ativação dessas defesas, muitas vezes, ocorre às custas de crescimento e produtividade, fator agravante para a agricultura (BECHTOLD; FIELD, 2018). A diferença entre as plantas, até entre espécies do mesmo gênero, são os tipos

de mecanismos adaptativos e/ou de defesa adotados para lidar com o déficit hídrico e as formas de recuperação após uma situação de estresse (BIANCHI; GERMINO; SILVA, 2016).

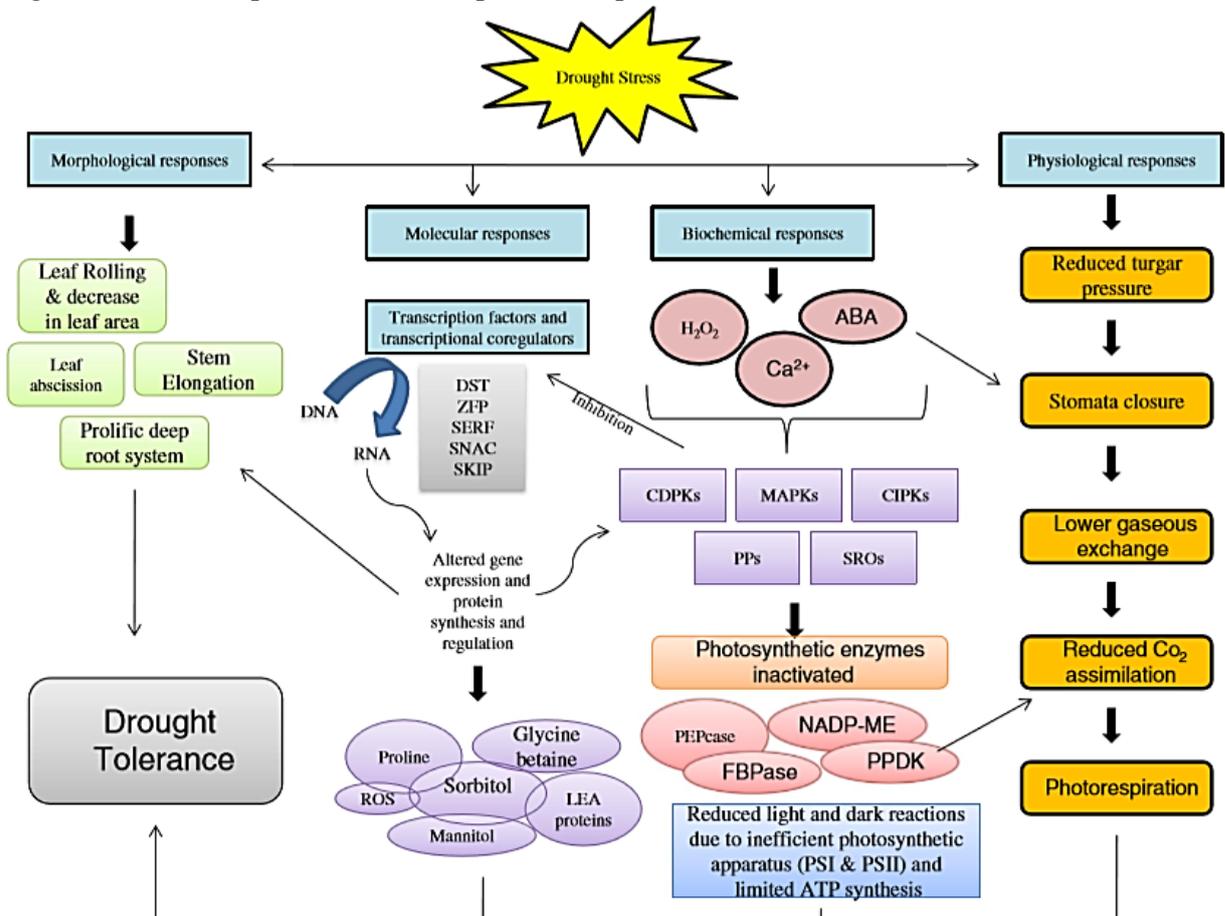
Estresses isolados ou interconectados levam à quebra da homeostase celular, causando danos à membranas e proteínas e, conseqüentemente à ativação de respostas moleculares, fisiológicas e/ou de desenvolvimento, devido à amplificação dos sinais pelas vias de transdução (FRAIRE-VELÁZQUEZ; BALDEIRAS-HERNÁNDEZ, 2013; NEPOMUCENO et al., 2011). Tais respostas controlam a transcrição e ativam diversos mecanismo de resposta, que podem levar ao reestabelecimento da homeostase e ao reparo das estruturas danificadas, ou, em situações de estresse severo ou quando a ativação de respostas é insuficiente, podem levar à destruição de proteínas, mudanças irreversíveis na conformação da membrana ou morte celular (FANG; XIONG, 2015; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; WANG et al., 2009). A existência de vários tipos de resposta pode estar relacionada com a severidade ou duração do estresse e com a espécie, fato que amplia a capacidade de adaptação.

Durante a progressão do déficit hídrico, as plantas passam por diversas fases. A fase de percepção, ativada junto com a primeira perturbação nas condições hídricas, é caracterizada pela perda da estabilidade de proteínas e membranas, dando início às respostas ao estresse. Na fase seguinte, de recuperação, começam os processos de reparo celular, como síntese de proteínas de reparo e osmoprotetores, o que culmina com a fase de tolerância, onde o organismo aumenta sua capacidade de suportar a situação estressante e passa a ser capaz de se manter com baixos teores de água nos tecidos, através de características adaptativas. Por fim, quando os processos celulares estão estáveis sob estresse contínuo e não há uma situação de exaustão, as plantas entram na fase de adaptação ou aclimatização (BASU et al., 2016; LAXA et al., 2019). Quando o estresse cessa, a planta entra em uma fase de reestabelecimento, onde começa a remover e reciclar todos os mRNAs, proteínas, substâncias químicas protetoras e compostos desnecessários que se acumularam nas células durante o processo de aclimatação e pelo período de estresse. Além disso, ocorrem mudanças no seu fluxo energético metabólico, com a reativação de certas atividades, como fotossíntese, respiração e biossíntese de lipídeos (TAIZ et al., 2017).

Em resposta ao déficit hídrico, as defesas podem ser derivadas de vários mecanismos, envolvendo diversos níveis metabólicos: transcricional, molecular, celular, fisiológico e fenológico (FIGURA 1). Isso porque existem várias vias de sinalização celular, desde a percepção do sinal até a expressão gênica nos seus diferentes níveis (ZARGAR et al., 2017). Comumente, as respostas fisiológicas e fenotípicas incluem diminuição da condutância estomática, alterações na arquitetura da raiz e das folhas, ajuste osmótico, redução da

fotossíntese, aumento do conteúdo de ABA, produção de espécies reativas de oxigênio, alteração no metabolismo e acúmulo de carboidratos e modificações na estabilidade da membrana celular e no fluxo de íons (FANG; XIONG, 2015; KEMPA et al., 2008; RAMAKRISHNA; GILL, 2018; WANG et al., 2018b).

Figura 1 – Modelo para a rede de respostas das plantas ao déficit hídrico.



Legenda: Em resposta ao déficit hídrico, as plantas desenvolvem mecanismos de tolerância ao estresse em vários níveis metabólicos, que por sua vez afetam processos vitais, como fotossíntese, respiração, translocação de nutrientes e biossíntese de fitormônios. Essas respostas mobilizam diversos íons e compostos, em diversos tecidos e compartimentos celulares.

Fonte: ZARGAR et al., 2017.

Como a tolerância ao estresse é uma rede complexa de respostas, o balanço ótimo entre crescimento/produção de biomassa não é alcançado apenas pelas variações fisiológicas, mas pela combinação das respostas em diferentes níveis, para equivaler à severidade dos danos que o déficit hídrico pode causar, em longa duração. Outras alternativas incluem, alterações no padrão da expressão gênica e modificações epigenéticas; entretanto isso também não garante a capacidade da planta em sobreviver ao estresse (BRÄUTIGAM; CRONK, 2018; KINOSHITA;

SEKI, 2014; NEPOMUCENO et al., 2011; ZHANG; LANG, ZHU, 2018). A resposta à seca pode envolver também modificações em vias endógenas, alterando o padrão de fatores de transcrição (ABDEEN; SCHNELL; MIKI, 2010; WANG et al., 2018a).

A compreensão, em nível molecular, das diversas respostas de defesa aos estresses pode ser alcançada com o sequenciamento do genoma ou transcriptoma das espécies e a compreensão da função de um gene específico e da sua interação com outros genes (CHANG et al., 2018; HAN et al., 2015; WANG et al., 2018a). Pesquisas levaram à identificação de genes candidatos que podem integrar os processos de estresse (CHENG et al., 2018). Além disso, os avanços também levaram à melhor elucidação de como as vias de transdução de sinais mediadas por fitormônios desempenham um papel crítico nas respostas ao estresse (BASU et al., 2016; VERMA; RAVINDRAN; KUMAR, 2016).

Uma meta de todos esses estudos de respostas ao estresse é desenvolver culturas com aumento da tolerância às condições adversas. Como alternativa para melhorar a tolerância ao déficit hídrico, via interferência humana, existe o melhoramento clássico e a engenharia genética. As estratégias tradicionais de melhoramento incluem hibridações interespecíficas ou intergenéticas, mutações induzidas ou variação somaclonal de células e tecidos (AKPINAR; BUDAK; STUART, 2013; JAIN et al., 2019). Nesse contexto, a engenharia genética, utilizando técnicas de biotecnologia, ganha destaque pois dispõe de estratégias moleculares que permitem à planta tolerar por mais tempo a baixa disponibilidade de água; além disso, realizam estudos para caracterizar genes envolvidos em mecanismos específicos ou genes que regulam a expressão de outros genes, a fim de promover respostas de defesa no nível celular, resultado de várias rotas metabólicas simultâneas (CHANG et al., 2018; FAN et al., 2018; GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008; LAWLOR, 2012; NEPOMUCENO et al., 2011).

2.2.3 Dinâmica de carboidratos

Durante o dia a planta acumula sacarose e amido, como produtos finais da fotossíntese. A sacarose sintetizada no citosol a partir das trioses-fosfatos geradas nesse processo, pode ser translocada para os tecidos-dreno, ou pode ser armazenada nas folhas temporariamente na forma de amido (HARTMANN; TRUMBORE, 2016). O amido acumulado, chamado de amido transitório, é remobilizado e exportado na forma de hexoses para o resto da planta durante à noite, onde atua como substrato para a respiração celular e para as demais demandas metabólicas (ZANELLA et al., 2016). Isso é comum a plantas herbáceas e lenhosas, entretanto, em lenhosas as variações no acúmulo de amido são mais dependentes das condições ambientais

e o armazenamento é mais regulado (PIPER; FAJARDO, 2016; HOCH, 2017; SALA; WOODRUFF; MEINZER, 2012). O amido destaca-se como uma forma temporária de reserva de carbono, que, em situações de déficit hídrico passa a atuar na manutenção do turgor celular, ajudando a manter a turgidez e a integridade das células (DIETZE et al., 2014).

Durante o déficit hídrico, o acúmulo e a distribuição de carboidratos é afetada, uma vez que a fotossíntese passa a ser prejudicada. Em condições severas, os principais carboidratos, como amido, açúcares redutores e açúcares não-redutores sofrem mudanças no seu padrão de distribuição (HARTMANN; TRUMBORE, 2016). Quando o potencial hídrico é reduzido, é comum que solutos, como açúcares solúveis, passem a se acumular nas células, onde atuam no ajuste osmótico (BASU et al., 2016; HE et al., 2015). Entender como funciona a dinâmica desses compostos ajuda a compreender como funciona a alocação de recursos e a produção de biomassa vegetal (AUBRY et al., 2019).

Açúcares redutores são todos os carboidratos que possuem um grupo aldeído ou cetona livre e por isso, são capazes de sofrer oxidação na presença de agentes oxidantes e quando está em sua forma linear (SANTOS et al., 2017). No floema, os carboidratos são transportados na forma de açúcares não-redutores, pois são menos reativos, sendo a sacarose o açúcar dominante na seiva e o mais translocado (TAIZ et al., 2017). Por isso, a sacarose é tida como o soluto que cria a força motriz para a translocação de todos os outros solutos no floema (EOM et al., 2015). Dentre os açúcares redutores, a glicose e a frutose são os compostos principais, uma vez que participam da síntese de vários compostos e estruturas vegetais (HARTMANN; TRUMBORE, 2016).

Em espécies lenhosas, estudos na distribuição de carboidratos já foram realizados em florestas naturais, visando entender como a disponibilidade desses compostos afeta a sobrevivência das diferentes espécies (HAGEDORN et al., 2016; McDOWELL et al., 2008). Entretanto, em mudas ou em florestas plantadas ainda existem muitos fatores que prejudicam o entendimento dessa dinâmica, o que torna o processo pouco compreendido nessas condições, uma vez que as respostas mudam ao longo do desenvolvimento (GRANDA; CAMARERO, 2017; PIPER; FAJARDO; HOCH, 2017; HODECKER et al., 2018).

Para a quantificação dessas moléculas nos tecidos vegetais, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um dos métodos mais difundidos, entretanto, seu alto custo faz que a dosagem dos carboidratos ainda seja feita com os métodos baseados em colorimetria (GUSAKOV; KONDRATYEVA; SINITSYN, 2011; SANTOS et al., 2017).

2.2.4 Alterações moleculares em plantas sob déficit hídrico

Visando tolerância a condições de baixa disponibilidade de água e/ou seca, temos a seleção de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de osmoprotetores, como proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), prolina e rafinose; sinalização de fosfolipídios; ativação de rotas do ácido abscísico; fechamento estomático; enzimas antioxidantes e genes que codificam fatores de transcrição (CHEONG et al., 2002; DASGUPTA; DHARANISHANTHI; 2017; ESTRADA-MELO et al., 2015; FANG; XIONG, 2015; LAXA et al., 2019; LIM et al., 2015; MARTINS et al., 2018; NEPOMUCENO et al., 2011; WANG et al., 2018a; YAN et al., 2019).

A identificação dos genes expressos em resposta ao déficit hídrico é realizada, principalmente por análises do transcriptoma da espécie (SEKI et al., 2003). Entretanto, os padrões de regulação da expressão desses genes são complexos; alguns genes respondem ao estresse hídrico rapidamente (genes de resposta precoce ou *early-response genes*), enquanto outros são reprimidos ou induzidos lentamente (genes de resposta tardia ou *delayed-response genes*) (CHEONG et al., 2002). A indução rápida não requer síntese de proteínas estruturais e geralmente apresenta padrão transiente de expressão. Esses genes normalmente são fatores de transcrição, que mais tarde, irão ativar os genes de resposta tardia. Para genes responsivos ao estresse, este padrão (tardio) é mais comum pois apresenta expressão prolongada, o que favorece a manutenção do metabolismo vegetal nessas condições (CHEONG et al., 2002; ZHU, 2002).

O avanço das pesquisas sobre as respostas vegetais ao déficit hídrico também levaram à descoberta de várias vias de sinalização, como MAPK, ABF/bZIP, CBF/DREB e WRKY, que empregam fatores de transcrição sensíveis ao estresse para modelar as respostas de defesa à tensões abióticas específicas (ABDEEN; SCHNELL; MIKI, 2010; CHOI et al., 2000; HE; HE; DING, 2018; KIM, et al., 2018; WANG et al., 2016; YAN et al., 2019; ZHU et al., 2016). Esses fatores de transcrição atuam no controle da expressão de genes responsivos ao ABA (FUJITA et al., 2011).

2.2.5 Sinalização induzida pelo ácido abscísico

O ácido abscísico (ABA) é um fitormônio conhecido por modular respostas ao estresse, principalmente aquelas relacionadas à desidratação. A capacidade de se mover por longas distâncias permite que o ABA sirva como mensageiro do déficit hídrico (WANI et al., 2016).

Aumentos na sua biossíntese nas raízes levam à redistribuição desse hormônio para a parte aérea e o seu acúmulo nas folhas, onde exerce papel na redução da perda de água pela transpiração sob condições de estresse hídrico (BASU et al., 2016; DASZKOWSKA-GOLEC; SZAREJKO, 2013).

Em resposta à escassez de água, o ABA pode induzir respostas rápidas, como o fechamento estomático, ou respostas mais lentas, de acordo com a progressão do estresse, como ativação de fatores de transcrição e indução da expressão de genes mediados por elementos de resposta ao ácido abscísico (ABRE's) (CHOI et al., 2000; NEPOMUCENO et al., 2011). Além dos fatores de transcrição, a expressão gênica responsiva ao ABA também pode ser regulada por cascatas de transdução de sinais de proteínas quinase/fosfatase, por mensageiros secundários ou pela remodelação da cromatina, alterando o acesso e a ligação dos fatores de transcrição ao DNA (FUJITA et al., 2011; SOKOL et al., 2007). Essas vias interagem com outras rotas hormonais e podem regular respostas como taxa de transpiração, crescimento raiz/parte aérea, biossíntese de antocianinas, osmorregulação e expressão de enzimas antioxidantes (HE; HE; DING, 2018).

Quanto às respostas moleculares, os vegetais podem ativar rotas dependentes ou independentes de ABA (ZHU et al., 2002). Mesmo classificadas de maneira isolada, estas rotas podem atuar em cooperação e ambas estão envolvidas na resposta ao déficit hídrico (FUJITA et al., 2011).

Na via independente de ABA, foi identificada em *Arabidopsis thaliana* uma família de fator de transcrição, conhecida como DREB (do inglês *Dehydration Responsive Element Binding protein*). As proteínas DREB atuam no topo da cascata de eventos moleculares, induzindo respostas de defesa contra a desidratação celular, alta salinidade e frio (AGARWAL et al., 2006; LI et al., 2016). Em resposta ao déficit hídrico, o fator de transcrição DREB2A ativa a expressão de genes envolvidos neste estresse (LIU et al., 1998; MIZOI et al., 2013). Genes homólogos a essa família já foram identificados em várias espécies, com comprovada eficiência na melhora das respostas ao déficit hídrico (BIHANI; CHAR; BHARGAVA, 2011; CHEN et al., 2007; KIDOKORO et al., 2015; MARINHO et al., 2019; NASREEN; AMUDHA; PANDEY, 2013; QIN et al., 2007; REIS et al., 2014; TORRES et al., 2019).

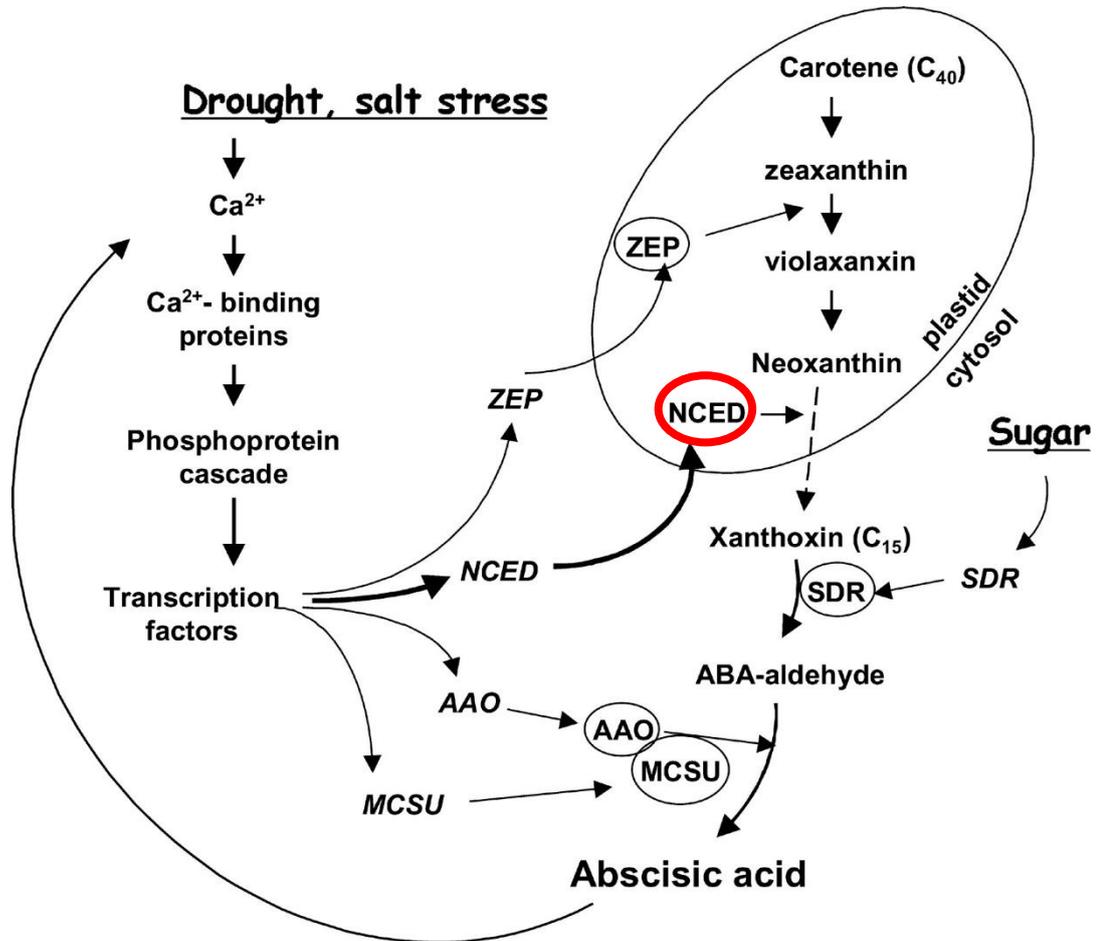
Na via dependente de ABA, é bem caracterizada a rota dependente de PYR/ PYL/RCAR (HAO et al., 2011). Membros da superfamília de proteínas PYR/PYL/RCAR são conservados nas plantas, localizadas no citosol ou no núcleo, e constituem a etapa inicial da rota central de transdução de sinal do ABA (CUTLER et al., 2010). Elas interagem com fosfatases de uma maneira dependente do ABA para regular a atividade a jusante de proteínas serinas/treoninas

quinase da família *Sucrose non-Fermenting Related Kinase2* (SnRK2) (HE; HE; DING, 2018). Ao se acumular nas células que estão sob déficit hídrico, o ABA se liga aos receptores PYR e inibe a atividade das fosfatases. Quando a sinalização do ABA diminui, as proteínas fosforiladas são inativadas ou destruídas (DEJONGHE; OKAMOTO; CUTLER, 2018).

Alterações nos níveis endógenos de ABA também estão diretamente relacionadas com o aumento da expressão de genes da família *NCED*, onde cada membro desempenha funções específicas relacionadas à resposta ao estresse, de acordo com a sua localização dentro dos plastídios (DEJONGHE; OKAMOTO; CUTLER, 2018). Entre os genes identificados, o *NCED3* apresenta expressão diferenciada em condições de baixa disponibilidade hídrica (ENDO et al., 2008; MARTINS et al., 2018; SU et al., 2011; WOO et al., 2011).

Em resposta ao déficit hídrico ocorre aumento na biossíntese de ABA nos tecidos foliares, processo que ocorre a partir de um intermediário do ciclo das xantofilas e é altamente regulado pela atividade da enzima *NCED* (9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenase) (ESTRADA-MELO et al., 2015; NAMBARA; MARION-POLL, 2005). A síntese do ABA tem início quando zeaxantina e anteraxantina são oxidadas à violaxantina, que sofre uma série de modificações estruturais até formar 9-*cis*-epoxicarotenoide. A clivagem oxidativa desse composto pela enzima *NCED* produz um intermediário de 15 carbonos, a xantoxina, que uma vez exportada para o citosol, é convertida em ABA através de uma reação de duas etapas via ABA-aldeído, em processo catalisados pela zeaxantina epoxidase (ZEP) (FIGURA 2) (DEJONGHE; OKAMOTO; CUTLER, 2018; NAMBARA; MARION-POLL, 2005; XIONG; ZHU, 2003).

Figura 2 – Modelo demonstrando a biossíntese do ABA.



Legenda: A biossíntese do ABA ocorre nos plastídios e no citosol. Genes são mostrados em *itálico*, enzimas biossintéticas são mostradas em círculos ovais pequenos e a etapa regulada pela enzima NCED é demonstrada pela seta tracejada. Em situações de estresse abiótico, genes da biossíntese de ABA são ativados por uma cascata de transdução de sinal dependente de cálcio (Ca^{2+}). Entre esses genes, o *NCED* é fortemente regulado pelo estresse, de maneira positiva. ZEP = zeaxantina epoxidase; NCED = 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase; AAO = ABA-aldeído oxidase; MCSU = MoCo sulfurase (FINKELSTEIN, 2013; NAMBARA; MARION-POLL, 2005; XIONG; ZHU, 2003).

Fonte: XIONG; ZHU, 2003.

2.2.6 Avaliação das alterações moleculares

As tecnologias para analisar o perfil transcricional de células ou tecidos selecionados permitem a análise de RNA's mensageiros e a análise da expressão gênica em larga escala (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006). Entre as técnicas disponíveis, a RT-qPCR (PCR quantitativa em tempo real ou PCR de transcrição reversa em tempo real) é a mais precisa para quantificar níveis de expressão de um determinado gene (LIU et al, 2014). Essa técnica é baseada na emissão de sinais de fluorescências, gerados por fluoróforos específicos para a fita

dupla de DNA ou por *primers* marcados por fluorescência em regiões específicas. Os sinais gerados são proporcionais à quantidade de produtos de PCR e o equipamento detecta o acúmulo do produto amplificado durante cada ciclo da reação (BUSTIN, 2002). Entre as vantagens dessa tecnologia estão a alta sensibilidade e especificidade e o fornecimento de dados rápidos e reprodutíveis (CAI et al., 2018).

Nas reações de RT-qPCR, a detecção dos produtos da PCR pode ser feita com o uso do SYBR Green® ou TaqMAN® e as análises dos diferentes níveis de expressão de um mesmo gene em diferentes cultivares, tecidos ou estádios de desenvolvimento, é feita por comparação (quantificação relativa) (NOVAIS; ALVES, 2004). Para essas análises, é necessário utilizar um gene normalizador, chamado de gene de referência, que deve ser um gene constitutivo e não variar diante das fases de desenvolvimento ou das condições experimentais (LIU et al., 2014).

Para uma análise mais ampla e global do transcriptoma, podem ser utilizadas ferramentas para o sequenciamento de RNA (RNA-seq). Esta técnica é utilizada para quantificar e analisar sequências de RNA em uma amostra, usando sequenciamento de segunda geração (NGS), com plataformas de sequenciamento de alto desempenho (HAN et al., 2015). Ele analisa o transcriptoma dos padrões de expressão gênica codificados dentro do RNA, gerando um grande volume de dados em pouco tempo (MARDIS, 2013; WANG et al., 2009). Para o sequenciamento, enzimas de transcriptase reversa convertem fragmentos de RNA em moléculas de cDNA (*complementary Desoxyribonucleic Acid*), que posteriormente, são fragmentadas, por processos físicos ou químicos, para a preparação das bibliotecas. As bibliotecas também são construídas através do processo de ligação com os adaptadores e amplificação dos fragmentos por diversos métodos, a depender da plataforma de sequenciamento (HEREDIA; VÁZQUEZ-POLETTI, 2016).

Entre as aplicações do RNA-seq, estão investigar e descobrir o transcriptoma e o conteúdo celular total de RNAs; prever quais genes estão ativados em uma célula, qual o seu nível de expressão e em quais momentos eles são ativados ou inativados; auxiliar na anotação de genes codificantes de proteínas; detectar de RNA's não-codantes e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs); quantificar alelos; descobrir rearranjos de transcritos e fazer análises de *splicing* alternativo (CHANG et al., 2018; FERNÁNDEZ; TRONCOSO; VALENZUELA, 2015; HAN et al., 2015).

Em eucalipto, essas técnicas já foram utilizadas para detecção de polimorfismos (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) (NOVAES et al., 2008) e em estudos específicos da influência do déficit hídrico na expressão gênica em *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. urophylla*

e em híbridos *E. urophylla* x *E. grandis* (CHENG et al., 2018; FAN et al., 2018; MARTINS et al., 2018; THUMMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012; VILLAR et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ABDEEN, A.; SCHNELL, J.; MIKI, B. Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor *ABF3*.

AGARWAL, P. K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, 2006.

AKPINAR, B. A.; BUDAK, H.; STUART, S. J. Genomics Approaches for Crop Improvement against Abiotic Stress. **The Scientific World Journal**, v. 3, n. 361921, 2013.

ANDRADE, G. de C. Consumo de água pelo eucalipto. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica (Ageitec)**, Brasília, 22 fev. 2019. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/eucalipto/arvore/CONTAG01_63_2572006132316.html>. Acesso em: 29 maio 2019.

AUBRY, E. et al. Lateral. Transport of Organic and Inorganic Solutes. **Plants**, v. 8, n. 20, 2019.

BASU, S. et al. Plant adaptation to drought stress. **F1000 Research**, v. 5, n. 1554, p. 1-10, 2016.

BATTIE-LACLAU, P. et al. Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. **New Phytologist**, v. 203, p. 401-413, 2014.

BECHTOLD, U.; FIELD, B. Molecular mechanisms controlling plant growth during abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 11, p. 2753-2758, 2018.

BERENGUER, H. D. P. et al. Differential physiological performance of two *Eucalyptus* species and one hybrid under different imposed water availability scenarios. **Trees**, n. 32, p. 415-427, 2018.

BERGAMASCHI, H. (Coord.) **Agrometeorologia Aplicada à Irrigação**. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 2 ed., 1992. 125 p.

BERTOLA, A. **Eucalipto – 100 anos de Brasil**. Setor de inventário florestal. – V&M Florestal. Ltda, Curvelo, 91 p., 2013. Disponível em: < http://www.celso-foelkel.com.br/artigos/outros/Eucal.ipto_100%20anos%20de%20Brasil_Alexandre_Bertola.pdf>. Acesso em: 25 maio 2019.

BIANCHI, L.; GERMINO, G. H.; SILVA, M. de A. Adaptação das Plantas ao Déficit Hídrico. **Acta Iguazu**, v. 5, n. 4, p. 15-32, 2016.

BIHANI, P.; CHAR, B.; BHARGAVA, S. Transgenic expression of sorghum *DREB2* in rice improves tolerance and yield under water limitation. **The Journal of Agricultural Science**, v. 149, n. 1, p. 95-101, 2011.

- BM REFLORESTAMENTO, 2014. Disponível em: <
<http://www.bmreflorestamento.com.br/produto/uocam-vm-01/>>. Acesso em: 30 maio 2019.
- BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 89-97, 1996.
- BRÄUTIGAM, K.; CRONK, Q. DNA Methylation and the Evolution of Developmental Complexity in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1447, p. 1-14, 2018.
- BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23-39, 2002.
- CAI, J. et al. Selection of appropriate reference genes for the detection of rhythmic gene expression via quantitative real-time PCR in Tibetan hulless barley. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2018.
- CEMADEN (Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais), 2018. **Sistema de Monitoramento de Seca para o Brasil – Julho/2018**. Disponível em: <
<https://www.cemaden.gov.br/sistema-de-monitoramento-de-seca-para-o-brasil-julho2018/>>. Acesso em: 31 maio 2019.
- CHANG, S. et al. Genetic engineering of trees: progress and new horizons. **In Vitro Cellular e Developmental. Biology – Plant**, v. 54, p.341-376, 2018.
- CHENG, L. et al. Expressional characterization of galacturonosyltransferase-like gene family in *Eucalyptus grandis* implies a role in abiotic stress responses. **Tree Genetics & Genomes**, v. 14, n. 81, p. 1-11, 2018.
- CHEN, M. et al. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 2, p. 299-305, 2007.
- CHEONG, Y. H. et al. Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal. Responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 129, p. 661-677, jun. 2002.
- CHOI, H. et al. ABFs, a Family of ABA-responsive Element Binding Factors. **The Journal Biological Chemistry**, v. 275, n. 3, p. 1723-1730, 2000.
- CORREDOIRA, E. et al. M. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. **Tree Physiology**, v. 35, p. 678-690, 2015.
- CUTLER, S. R. et al. Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 651-679, 2010.
- DASGUPTA, M. G.; DHARANISHANTHI, V. Identification of PEG-induced water stress responsive transcripts using co-expression network in *Eucalyptus grandis*. **Gene**, v. 627, p. 393-407, 2017.
- DEJONGHE, W.; OKAMOTO, M.; CUTLER, S. R. Small Molecule Probes of ABA Biosynthesis and Signaling. **Plant and Cell Physiology**, v.59, n. 8, p. 1-10, 2018.

- CIB (Conselho de Informações sobre Biotecnologia), 2008. **Guia do eucalipto: Oportunidades para um desenvolvimento sustentável**. Disponível em: <https://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- CUTLER, S. R. et al. Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 651-679, 2010.
- DASZKOWSKA-GOLEC, A.; SZAREJKO, I. The Molecular Basis of ABA-Mediated Plant Response to Drought. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. (Eds.). **Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture**. Croatia: Intechopen, 2013, p. 103-133. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/45842>>. Acesso em: 3 jun. 2019.
- DIAS, T. K. R. et al. The beetle *Costalimaita ferruginea* (Coleoptera: Chrysomelidae) in *Eucalyptus* plantations in transition area of Amazon and Cerrado Biomes. **Brazilian Journal of Biology**, v.78 n.1, p. 47-52, 2018.
- DIETZE, M. C. et al. Nonstructural Carbon in Woody Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 2.1-2.21, 2014.
- DJEUGAP, J. F. et al. Fungi associated with seedling diseases of *Eucalyptus saligna* and *Prunus africana* in Cameroon and chemical control of Cercospora leaf spot. **International Journal of Agriculture and Biosciences**, v.7, n.1 p.1-6, 2018.
- DOBROWOLSKA, I. et al. Histological analysis reveals the formation of shoots rather than embryos in regenerating cultures of *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 319-326, 2017.
- ENDO, A., et al. Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. **Plant Physiology**, v. 147, n. 4, p.1984-1993. 2008.
- EOM, J.-S. et al. SWEETS, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. **Plant Biology**, n. 25, p. 53-62, 2015.
- ESTRADA-MELO, A. C. et al. Overexpression of an ABA biosynthesis gene using a stress-inducible promoter enhances drought resistance in petunia. **Horticulture Research**, v. 2, n. 15013, p. 1-9, 2015.
- FAN, C. et al. Characterization of *Brassinazole resistant (BZR)* gene family and stress induced expression in *Eucalyptus grandis*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 5, p. 821-831, 2018.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2016. **Global forest resources assessment 2015: How are the world's forests changing?** 2 ed. 54 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4793e.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2019.
- FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 673-689, 2015.
- FARIA, J. R. et al. Desenvolvimento de *Eucalyptus urograndis* no município de Corumbá-GO. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 2, p. 9-17, 2013.

- FAUSTINO, L. A. et al. Aspectos fisiológicos do eucalipto em convivência com três espécies de plantas daninhas. **Revista do Instituto Florestal**. São Paulo, v. 29, n. 2, p. 145-155, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.24278/2178-5031.201729201>>. Acesso em: 25 maio 2019.
- FENSHAM, R. J. et al. Dominant tree species are at risk from exaggerated drought under climate change. **Global Change Biology**, p. 3777-3785, 2015.
- FERNANDES, E. M.; CAIRO, P. A. R.; NOVAES, A. B. de. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica. **Ciência Rural**, v. 45, n.1, p. 29-34, 2005.
- FERNÁNDEZ, F.; TRONCOSO, V.; VALENZUELA, S. Transcriptome Profile in Response to Frost Tolerance in *Eucalyptus globulus*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, p. 1472-1485, 2015.
- FINKELSTEIN, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. **The Arabidopsis Book**, v. 11, p.1-52, 2013.
- FLORENCE, R. G. (Aut.) **Ecology and Silviculture of Eucalypt Forests**. Collingwood: CSIRO, 2004, 413 p.
- FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; BALDEIRAS-HERNÁNDEZ, V. M. Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. (Eds). **Abiotic Stress – Plant Responses and Applications in Agriculture**. Croatia: IntechOpen, p. 25-48, 2013.
- FUJITA, Y. et al. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, p. 509-525, 2011.
- GONÇALVES, J. L. de M. et al. Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 6-27, 2013.
- GRANDA, E.; CAMARERO, J. J. Drought reduces growth and stimulates sugar accumulation: new evidence of environmentally driven non-structural carbohydrate use. **Tree Physiology**, n. 37, p. 997-1000, 2017.
- GRATTAPAGLIA, D. et al. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p. 463-508, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, v. 179, p. 911-929, 2008.
- GUSAKOV, A. V; KONDRATYEVA, E. G.; SINITSYN, A. P. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2011, p. 1-4, 2011.
- HAGEDORN, F. et al. Recovery of trees from drought depends on belowground sink control. **Nature Plants**, v. 2, n. 16111, p. 1-5, 2016.
- HAN, Y. et al. Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 9, p. 29-46, 2015.
- HAO, Q. et al. The Molecular Basis of ABA-Independent Inhibition of PP2Cs by a Subclass of PYL Proteins. **Molecular Cell**, v. 42, p. 662-672, 2011.

- HARTMANN, H.; TRUMBORE, S. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. **New Phytologist**, v. 211, p. 386-403, 2016.
- HASIDEBER, R. et al. Summer drought alters carbon allocation to roots and root respiration in mountain grassland. **New Phytologist**, v.205, n. 3, p. 1117-1127, 2015.
- HE, M.; HE, C.-Q.; DING, N.-Z. Abiotic Stress: General. Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1771, p. 1-18, 2018.
- HEREDIA, U. L. de; VÁZQUEZ-POLETTI, J. L. RNA-seq analysis in forest tree species: bioinformatic problems and solutions. **Tree Genetics e Genomes**, v. 12, n. 30, p. 1-17, 2016.
- HE, X. et al. A sucrose: fructan-6-fructosyltransferase (*6-STF*) gene from *Psathyrostachys huashanica* confers abiotic stress tolerance in tobacco. **Gene**, v. 570, p. 239-247, 2015.
- HODECKER, B. E. R. et al. Water availability preceding long-term drought defines the tolerance of *Eucalyptus* to water restriction. **New Forests**, v. 49, p. 173-195, 2018.
- IBÁ (Indústria Brasileira de Árvores Plantadas), 2018a. **A indústria de árvores plantadas e as mudanças climáticas**. 6 p. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/pdf/info-mudancas-climatica-2018.pdf>>. Acesso em: 27 maio 2019.
- IBÁ (Indústria Brasileira de Árvores Plantadas), 2018b. **Árvores plantadas e recursos hídricos**. 7 p. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/pdf/pt-info-agua-2018.pdf>>. Acesso em: 29 maio 2019.
- IBÁ (Indústria Brasileira de Árvores), 2019. **Cenários IBÁ: estatísticas da Indústria Brasileira de Árvores**. 7 p. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/e-mail-marketing/cenarios/cena-rios-57-1otrim-2019-iba.pdf>>. Acesso em: 27 maio 2019.
- IWMI (International Water Management Institute), 2017. **IWMI Annual Report 2017**, 40 p. Disponível em: <http://www.iwmi.cgiar.org/About_IWMI/Strategic_Documents/Annual_Reports/2018/iwmi-annual-report-2017.pdf>. Acesso em: 8 mar. 2019.
- JAIN, D. et al. The ‘Omics’ Approach for Crop Improvement Against Drought Stress. In: RAJPAL V., SEHGAL D., KUMAR A., RAINA S. (Eds). **Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches**. Cham: Springer, p. 183-214. 1 ed, 2019.
- JORDAN, G. J.; POTTS, B. M.; CLARKE, A. R. Susceptibility of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* to sawfly (*Perga affinis* ssp. *insularis*) attack and its potential impact on plantation productivity. **Forest Ecology and Management**, v. 160, n. 1-3, p. 189-199, 2002.
- KAUR, G.; ASTHIR, B. Molecular responses to drought stress in plants. **Biologia Plantarum**, v. 61, n. 2, p. 201-209, 2017.
- KEMPA, S. et al. A Central. Role of Abscisic Acid in Stress-Regulated Carbohydrate Metabolism. **PLOS ONE**, v. 3, n. 12, p. 1-9, 2008.
- KIDOKORO, S. et al. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. **The Plant Journal**, v. 81, p. 505-518, 2015.

- KIM, H. J. et al. Confirmation of Drought Tolerance of Ectopically Expressed *AtABF3* Gene in Soybean. **Molecules and Cells**, v. 41, n. 5, p. 413-422, 2018.
- KIM, J.-B.; KANG, J.-Y.; KIM, S. Y. Over-expression of a transcription factor regulating ABA responsive gene expression confers multiple stress tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, p. 459-466, 2004.
- KINOSHITA, T.; SEKI, M. Epigenetic Memory for Stress Response and Adaptation in Plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 11, p. 1859-1863, 2014.
- LAXA, M. et al. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. **Antioxidants**, v. 8, n. 94, p. 1-31, 2019.
- LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 1, p. 83-108, 2012.
- LELU-WALTER, M. A. et al. High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, p. 137-155, 2018.
- LIM, C. W. et al. Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 15251-15270, 2015.
- LI, S. et al. Effects of drought and salt-stresses on gene expression in *Caragana korshinskii* seedlings revealed by RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 17, n. 200, p. 1-19, 2016.
- LIU, J. et al. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in *Panax ginseng* at Different Stages of Growth and in Different Organs. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1-14, 2014.
- LIU, Q. et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 10, n. 8, p. 1391-1406, 1998.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2017. **Descrições de cultivares de eucalipto**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/publicacoes/descricoes-de-cultivares-de-eucal.ipto.xls/view>>. Acesso em: 30 maio 2019.
- MARCOLINO-GOMES, J. et al. Diurnal Oscillations of Soybean Circadian Clock and Drought Responsive Genes. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2014.
- MARDIS, E. R. Next-Generation Sequencing Platforms. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 6, p. 287-303, 2013.
- MARINHO, J. P. et al. Metabolic alterations in conventional and genetically modified soybean plants with GmDREB2A;2 FL and GmDREB2A;2 CA transcription factors during water deficit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 140, p. 122-135, 2019.

- MARTINS, G. S. et al. Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 229, p. 122-131, 2018.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MIZOI, J. et al. GmDREB2A;2, a Canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-Type Transcription Factor in Soybean, Is Posttranslationally Regulated and Mediates Dehydration-Responsive Element-Dependent Gene Expression. **Plant Physiology**, v. 161, p. 346-361, 2013.
- McDOWELL, N. et al. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? **New Phytologist**, v. 178, p. 719-739, 2008.
- MOURA, V. P. G. O germoplasma de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake no Brasil. **Comunicado Técnico**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 111, p. 1-12, 2004.
- MYBURG, A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-374, 2014.
- NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 165-185, 2005.
- NASREEN, S.; AMUDHA, J.; PANDEY, S. S. Isolation and characterization of Soybean DREB 3 transcriptional activator. **Journal of Applied Biology e Biotechnology**, v. 1, n. 2, p.9-12, 2013.
- NAVARRETE-CAMPOS, D. et al. Drought effects on water use efficiency, freezing tolerance and survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus globulus* x *nitens* cuttings. **New Forests**, v. 44, p. 119-134, 2013.
- NEPOMUCENO, A. L. et al. Plantas geneticamente modificadas para tolerância a estresses abióticos. In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G. (Aut). **Plantas Geneticamente Modificadas: Desafios e Oportunidades para Regiões Tropicais**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011, p. 119-138.
- NEPOMUCENO, A. L. et al. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 23, p. 12-18, 2001.
- NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559-1582, 2006.
- NOVAES, E. et al. High-throughput gene and SPN discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome. **BMC Genomics**, v. 9, n. 312, p. 1-14, 2008.
- NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2010. **Securing food's future**. 60 p. Disponível em: <https://issuu.com/oecd.publishing/docs/oecdobserver_278_march2010>. Acesso em: 28 maio 2019.

- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2019. **Air and GHG emissions (indicator)**. Disponível em: <<https://data.oecd.org/air/air-and-ghg-emissions.htm>>. Acesso em: 4 mar. 2019.
- OUYANG, L. et al. Efficient Regeneration of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* from Stem Segment. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 3, p. 329-334, 2012.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos. Escolha de cultivares de eucaliptos em função do ambiente e do uso. **Comunicado Técnico**, Embrapa Florestas, n. 316, p. 1-11, 2013.
- PATT, R.; KORDSACHIA, O.; FEHR, J. European hardwoods versus *Eucalyptus globulus* as a raw material for pulping. **Wood Science Technology**, v. 40, p. 39-48, 2006.
- PICHELLI, K.; SOARES, S. Eucalipto. **Transferência de Tecnologia Vegetal. (TT Florestal)**, Colombo, 30 maio 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia/eucal.ipto/perguntas-e-respostas>>. Acesso em: 30 maio 2019.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 869-882, 2011.
- PIPER, F. I.; FAJARDO, A. Carbon dynamics of *Acer pseudoplatanus* seedlings under drought and complete darkness. **Tree Physiology**, v. 36, p. 1400-1408, 2016.
- PIPER, F. I.; FAJARDO, A.; HOCH, G. Single-provenance mature conifers show high non-structural carbohydrate storage and reduced growth in arid location. **Tree Physiology**, v. 37, p. 1001-1010, 2017.
- QIN, F. et al. Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. **The Plant Journal**, n. 50, p. 54-69, 2007.
- RAMAKRISHNA, A.; GILL, S. S. (Eds) **Metabolic Adaptations in Plants During Abiotic Stress**. Boca Raton: CRC Press, 1 ed., 2018. 442 p.
- REIS, R. R. et al. Induced over-expression of *AtDREB2A* CA improves drought tolerance in sugarcane. **Plant Science**, v. 221, n. 222, p. 59-68, 2014.
- REVISTA DA MADEIRA, 2003. Curitiba, ed. 75. Disponível em: <http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=399&subject=Esp%E9cies&title=Descri%E7%E3o%20de%20al.gumas%20esp%E9cies%20de%20eucal.ipto>. Acesso em: 30 maio 2019.
- RODRIGUES, F. A. et al. Daytime soybean transcriptome fluctuations during water deficit stress. **BMC Genomics**, v. 16, n. 505, p. 1-19, 2015.
- SAH, S. R.; REDDY, K. R. LI, J. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 571, p. 1-26, 2016.
- SALA, A.; WOODRUFF, D. R.; MEINZER, F. C. Carbon dynamics in trees: feast or famine? **Tree Physiology**, v. 32, p. 764-775, 2012.

- SAVAGE, J. A. et al. Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: how does phloem physiology affect plant ecology? **Plant, Cell and Environment**, v. 39, p. 709-725, 2016.
- SCANAVACA JÚNIOR, L.; GARCIA, J. N. Potencial de melhoramento genético em *Eucalyptus urophylla* procedente da Ilha das Flores. **Scientia Forestalis**, n. 63, p. 23-32, 2003.
- SEKI, M. et al. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 14, v. 194-199, 2003.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 2210-227, 2007.
- SILVA, I. M. de A. et al. Determination of parameters for selection of *Eucalyptus* clones tolerant to drought. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 40, p. 3940-3949, 2016.
- SOKOL, A. et al. Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and *Arabidopsis* cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. **Planta**, v. 227, n. 1, p. 245-254, 2007.
- SOUZA, A. M. S. de. et al. Expression of NCED gene in colored cotton genotypes subjected to water stress. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 8, p. 692-696, 2016.
- SOUZA, F. M. L. et al. Características de crescimento, densidade básica e composição química da madeira de *Eucalyptus* spp na região de Ribas do Rio Pardo-MS. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 11, n. 4, p.350-359, 2017.
- SU, Z. et al. Association Analysis of the *nced* and *rab28* Genes with Phenotypic Traits Under Water Stress in Maize. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.29, n. 3, p.714-722, 2011.
- TAIZ, L. et al. (Eds.); [MASTROBERTI, A. A. et al. (trad.)] **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed., 2017, 888 p.
- THALMANN, M.; SANTELIA, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, v. 214, p. 943-951, 2017.
- THUMMA, B. R.; SHARMA, N.; SOUTHERTON, S. G. Transcriptome sequence of *Eucalyptus camaldulensis* seedlings subjected to water stress reveals functional single nucleotide polymorphisms and genes under selection. **BMC Genomics**, v. 13, n. 364, p. 1-21, 2012.
- TORRES, L. F. et al. Expression of DREB-Like Genes in *Coffea canephora* and *C. arabica* Subjected to Various Types of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 98-116, 2019.
- TORQUEBLAU, E. (Ed.) **Climate Change and Agriculture Worldwide**. Montpellier: Springer, 2015, 348 p.

- VALDÉS, A. E. et al. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 79, p. 263-276, 2013.
- VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P. P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 86, p. 1-10, 2016. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 86, p. 1-21, 2016.
- VILLAR, E. et al. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **BMC Genomics**, v. 12, n. 538, p. 1-18, 2011.
- XIONG, L.; ZHU, J.-K. Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 133, p. 29-36, 2003.
- WANG, Z. et al. Overexpressing *Arabidopsis ABF3* increases tolerance to multiple abiotic stresses and reduces leaf size in alfalfa. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 199-208, 2016.
- WANG, P. et al. Exploring transcription factors reveals crucial members and regulatory networks involved in different abiotic stresses in *Brassica napus* L. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 202, 2018a.
- WANG, Z. et al. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. **Biology Open**, v. 7, p. 1-9, 2018b.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.
- WANI, S. H. et al. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **The Crop Journal**, v. 4, p. 162-176, 2016.
- WOO, D. H. et al. *Arabidopsis lenc1* mutant displays reduced ABA accumulation by low *AtNCED3* expression under osmotic stress. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.140-147, 2011.
- WU, S. et al. Enhancing Omics Research of Crop Responses to Drought under Field Conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 174, p. 1-5, 2017.
- YAN, H. Genome-Wide Characterization, Evolution, and Expression Profiling of VQ Gene Family in Response to Phytohormone Treatments and Abiotic Stress in *Eucalyptus grandis*. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1765, p. 1-16, 2019.
- ZANELLA, M. et al. β -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 6, p. 1819-1826, 2016.
- ZARGAR, S. M. et al. Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. **Plant Gene**, v. 11, p. 154-159, 2017.
- ZHANG, H.; LANG, Z.; ZHU, J.-K. Dynamics and function of DNA methylation in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 489-506, 2018.

ZHU, J.-K. Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cell**, n. 167, p. 313-324, 2016.

ZHU, J.-K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

SEGUNDA PARTE

Artigos

ARTIGO 1: Perfil transcriptômico de *Eucalyptus* spp. em resposta ao déficit hídrico.

ARTIGO 1: Perfil transcriptômico de *Eucalyptus* spp. em resposta ao déficit hídrico.**RESUMO**

Eventos de seca, acompanhados de aumentos na temperatura média global, serão os principais limitantes da produção agrícola num futuro próximo. A fim de identificar mecanismos de resposta e/ou tolerância ao déficit hídrico em eucalipto, dois clones contrastantes foram caracterizados em nível transcricional, via RNA-seq. Os clones analisados foram VM01 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) e VM05 (*E. urophylla*). O objetivo foi identificar e caracterizar genes, fatores de transcrição e vias regulatórias envolvidas nas respostas ao déficit hídrico, que podem levar ao desenvolvimento da tolerância e tem potencial para serem usados em programas de melhoramento genético. Os dados do sequenciamento revelaram centenas de genes diferencialmente expressos entre os clones e os tratamentos impostos e redes de correlação de fatores de transcrição permitiram identificar famílias responsivas ao déficit hídrico em eucalipto. Entre as várias características vegetais moduladas por este estresse, algumas se destacaram entre os clones, sendo a dinâmica de ABA e o metabolismo do carbono as que apresentaram maiores alterações. As diferenças observadas contribuíram para gerar e caracterizar o transcriptoma dos clones e indicaram que eles apresentam respostas diferentes frente ao estresse. Os genes identificados são potenciais candidatos para estudos futuros envolvendo déficit hídrico e para uso em programas de melhoramento.

Palavras-chave: RNA-seq. Eucalipto. Seca.

ABSTRACT

Drought events, accompanied by increases in global average temperature, will be the main constraints on agricultural production in the near future. In order to identify response mechanisms and/or tolerance to water deficit in eucalyptus, two contrasting clones were characterized at transcriptional level via RNA-seq. The clones analyzed were VM01 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) and VM05 (*E. urophylla*). The objective was to identify and characterize genes, transcription factors and regulatory pathways involved in water deficit responses, which may lead to the development of tolerance and have the potential to be used in breeding programs. Sequencing data revealed hundreds of differentially expressed genes between clones and the imposed treatments and transcription factor correlation networks allowed to identify families responsive to water deficit in eucalyptus. Among the various vegetable characteristics modulated by this stress, some stood out among the clones, with ABA dynamics and carbon metabolism showing the greatest alterations. The differences observed contributed to generate and characterize the transcriptome of the clones and indicated that they present different responses to stress. The identified genes are potential candidates for future studies involving water deficit and for use in breeding programs.

Keywords: RNA-seq. Eucalyptus. Drought.

INTRODUÇÃO

Diversos estresses bióticos e abióticos comprometem o crescimento e o desenvolvimento das plantas em vários níveis. Entre eles, o estresse causado pela escassez de água é o mais agravante, pois causa perdas de rendimento em plantações pelo mundo todo. Além disso, eventos como seca e temperaturas extremas serão cada vez mais comuns nos próximos anos, agravando esse quadro (FAO, 2016). Por isso, é de extrema urgência compreender como culturas tolerantes à baixa disponibilidade hídrica sobrevivem frente a essas situações extremas e como seus mecanismos podem ser utilizados para beneficiar as demais plantas (HE; HE; DING, 2018).

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) é a espécie florestal mais plantada no Brasil, com altos níveis de produtividade, devido à sua adaptação a diversas condições climáticas e tipos de solo (IBÁ, 2019; SCANAVACA JÚNIOR; GARCIA, 2003). Essa espécie pertence ao gênero Myrtaceae e compreende mais de 700 espécies e híbridos, com diferentes respostas frente condições adversas, como a escassez de água, e diferentes características genômicas (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008; MYBURG et al., 2014).

Entre as respostas vegetais de sobrevivência ao déficit hídrico, existem aquelas mais generalistas, como fechamento estomático, produção de espécies reativas de oxigênio, ativação de cascatas de transdução de sinais, alterações no fluxo de íons e modificações na arquitetura radicular (BASU et al., 2016; BERENQUER et al., 2018; LIM et al., 2015; OLLAS; DODD, 2016; WANG et al., 2018b; ZHANG et al., 2018); e aquelas mais específicas, como alterações no padrão de expressão gênica, que variam entre espécies e até mesmo entre clones, justificando os estudos para esclarecer as diferenças entre os indivíduos tolerantes e sensíveis. Estas respostas estão inter-relacionadas e sob controle de uma rede complexa, que envolve a ativação de genes e fatores de transcrição e interação entre fitormônios específicos (CHENG et al., 2018; KIM et al., 2018; UMEZAWA et al., 2010; VERMA; RAVINDRAN; KUMAR, 2016; SIMURA et al., 2018).

Para entender como essa rede molecular está relacionada com as respostas ao déficit hídrico, uma das ferramentas utilizadas é o sequenciamento do transcriptoma da espécie, via a técnica de RNA-seq. Atualmente, esta abordagem apresenta baixo custo e oferece uma estratégia para gerar perfis do transcriptoma com alta eficiência e velocidade, para a descoberta de genes e para análises de expressão gênica *in silico*. Assim, genes com expressão diferencial entre as amostras podem ser identificados e correlacionados com os fenótipos observados, via bioinformática, em um processo que culmina com a formação de novas hipóteses sobre as

alterações metabólicas frente a situações de estresse (FERNÁNDEZ; TRONCOSO; VALENZUELA, 2015).

Em diversas espécies de plantas sob déficit hídrico foi observado, através do RNA-seq, elevada associação entre fatores de transcrição e diferentes vias metabólicas e correlação direta desses elementos com a progressão do estresse e com a hora de coleta das amostras. (DUGAS et al., 2011; GONG et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015; SPOKEVICIUS et al., 2017; VINSON et al., 2018; WANG et al., 2018a).

Por isso, os objetivos deste estudo foram caracterizar o transcriptoma de dois clones contrastantes de eucalipto e examinar a expressão diferencial de genes em resposta ao déficit hídrico e à reidratação, via análise de dados de RNA-seq. Os materiais avaliados foram os clones VM01 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) e VM05 (*E. urophylla*), em quatro condições hídricas diferentes (plantas sempre irrigadas, plantas que passaram por três e seis dias de déficit hídrico e plantas irrigadas após seis dias de déficit hídrico). Com isso, foi possível determinar vias regulatórias diferentes entre os dois materiais genéticos e identificar e correlacionar novos genes envolvidos com respostas ao déficit hídrico, para possíveis usos em programas de melhoramento genético.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das plântulas *in vitro*

O material vegetal foi clonado, visando reduzir a variação genotípica das plantas. Para isso, plantas produzidas em viveiro dos clones VM01 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) e VM05 (*E. urophylla*) foram cedidas pela empresa Vallourec® e introduzidas *in vitro*, via ápice caulinar, no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

O processo de obtenção das plântulas foi conduzido em condições controladas na sala de crescimento. Os frascos com material vegetal foram mantidos durante todo o processo de multiplicação, alongamento e enraizamento sob fotoperíodo de 16h/luz, temperatura de 26 ± 1 °C e $30 \text{ J.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Em todas as etapas da micropropagação, o meio de cultura utilizado como base foi o WPM ou *Wood Plant Medium* (LLOYD; McCOWN, 1981), suplementado com diferentes fontes de carbono e concentrações de reguladores de crescimento, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e autoclavado a 120°C e 1 atm, por 20 minutos.

Plantas dos dois clones, já estabelecidas *in vitro*, foram multiplicadas mensalmente em meio WPM, suplementado com 20 g.L^{-1} de sacarose; 4 g.L^{-1} de ágar; $2,22 \mu\text{M}$ de BAP e $107,41$

μM de ANA. Após a multiplicação do material vegetal, as brotações foram transferidas para um novo meio WPM, suplementado com 20 g.L^{-1} de sacarose; 4 g.L^{-1} de ágar; $4,44 \mu\text{M}$ de BAP; $49,20 \mu\text{M}$ de AIB e $53,70 \mu\text{M}$ de ANA, para alongamento da parte aérea. Após 30 dias em meio de alongamento, a parte aérea foi separada das brotações e transferida para o meio de enraizamento, onde ficaram por 31 dias, até atingirem o tamanho ideal para serem aclimatizadas na casa de vegetação (temperatura máxima 28°C). Para essa transferência, o tamanho das plântulas foi padronizado em 2,5 cm e o meio de enraizamento utilizado foi o $\frac{1}{2}$ WPM, suplementado com 15 g.L^{-1} ; de glicose; 4 g.L^{-1} de ágar; $4,44 \mu\text{M}$ de BAP; $49,20 \mu\text{M}$ de AIB e $53,70 \mu\text{M}$ de ANA.

Aclimatização das plantas em casa de vegetação

As plântulas que enraizaram *in vitro* foram transferidas para bandejas plásticas para mudas (50 cm^3), com fundo cônico, contendo vermiculita. Para aclimatização, as bandejas foram mantidas cobertas com plástico transparente por 14 dias e as plântulas foram irrigadas todos os dias. Após o período de cobertura total (7 dias), o plástico foi aberto parcialmente, todos os dias, para permissão das trocas gasosas e as mudas continuaram sendo irrigadas diariamente. Passados mais 7 dias, a cobertura foi totalmente removida e as plantas foram mantidas nas bandejas até atingirem o tamanho ideal para transplântio. Durante o período em que as plantas ficaram nas bandejas, elas foram adubadas com solução nutritiva de macro e micronutrientes duas vezes por semana.

Plantas que sobreviveram ao processo de aclimatização foram selecionadas, com base no tamanho, e transplantadas para copos plásticos de 700 mL contendo 600 g de substrato úmido. O substrato utilizado foi coletado dentro do campus da UFLA, classificado com latossolo vermelho distroférico, após análise e correção do solo, e seco totalmente na casa de vegetação antes do uso. Para a transferência das plantas, o substrato foi colocado em copos plásticos de 700 mL, pesado e molhado com 700 mL de água. Após a transferência, o substrato foi molhado com mais 250 mL de água e as plantas foram adubadas com a mesma solução usada nas plântulas da bandeja.

Após 30 dias nos copos, com irrigação e adubação periódicas (400 mL de água/dia), foi feita nova seleção das plantas para padronização dos tamanhos e separação dos clones em oito tratamentos e quatro blocos.

Estabelecimento do estresse

O experimento foi constituído por oito tratamentos, com 12 plantas por tratamento, divididas em quatro blocos (TABELA 1.1). Ao total, foram utilizadas 96 plantas por clone.

Tabela 1.1 – Tratamentos e dias de estresse* impostos à cada clone.

TRATAMENTOS	CONDIÇÃO HÍDRICA
CT (Controle)	Sempre irrigado
T1	1 dia de estresse
T2	2 dias de estresse
T3	3 dias de estresse
T4	4 dias de estresse
T5	5 dias de estresse
T6	6 dias de estresse
RS (Resiliência)	6 dias de estresse seguido por 2 dias de irrigação

* Como estresse, entende-se “dias sem água”.

Antes da suspensão da irrigação, todos os copos foram irrigados até a capacidade de campo e pesados (peso inicial).

Análises e coleta do material vegetal

Após os dias de déficit hídrico (TABELA 1.1), foram feitas as análises e coletas listadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Análises e coletas realizadas em cada tratamento, para os dois clones*.

ANÁLISE	PLANTAS ANALISADAS	HORÁRIO DA ANÁLISE/COLETA
Potencial hídrico	Três plantas de cada tratamento, sendo uma planta de cada bloco; folha do 2º par de folhas completamente expandidas	5 horas
Pesagem dos copos (Peso final)	Todas as plantas de todos os tratamentos	7 horas e 30 minutos
Análises fisiológicas (taxa fotossintética, transpiração, carbono interno, condutância estomática)	Nove plantas de cada tratamento, dos quatro blocos; folha do 2º par de folhas completamente expandidas	9 horas
Eficiência dos fotossistemas na luz e no escuro	Mesmas plantas utilizadas para as análises fisiológicas	14 horas
Coleta de folhas quantificação de ácido abscísico	Duas plantas de cada bloco; 3º par de folhas completamente expandidas	18 horas
Coleta de folhas para quantificação de carboidratos	Duas plantas de cada bloco; mesmas plantas analisadas com o IRGA; folha do 2º par de folhas completamente expandidas	18 horas
Coleta de folhas para análises de expressão gênica e RNA-seq	Duas plantas de cada bloco; folhas usadas para as análises fisiológicas	18 horas
Massa fresca e massa seca	Mesmas plantas usadas para análise do potencial hídrico	22 horas

* Coletas e análises realizadas na casa de vegetação, com temperatura entre 25-28°C.

As folhas coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C até realização das análises em laboratório (FIGURA 1.1). Para determinação da massa fresca, a parte aérea das plantas foi excisada e pesada; em seguida, seguiram para estufa de secagem à 65°C, onde foram novamente pesadas para determinação da massa seca, após atingirem peso constante.

Figura 1.1 – Modelo representando as folhas coletadas para as análises em laboratório.



Fonte: Do autor (2019).

Todos os dados foram coletados em um único dia, para todos os tratamentos, exceto resiliência (RS). Plantas do tratamento RS foram reidratadas na mesma manhã das coletas dos demais tratamentos e após 48 horas da irrigação, as plantas que sobreviveram passaram pelas mesmas análises e coletas listadas na Tabela 1.2.

Extração de RNA total

Para a extração de RNA total, selecionaram-se os tratamentos que apresentaram as maiores diferenças nas análises de trocas gasosas, taxa de fotossíntese (dados não mostrados) e potencial hídrico e em observações visuais da murcha foliar. Tecido foliar das amostras de cada bloco foram unidos em um *pool* para a extração do RNA com o *Kit ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System* (Promega®), segundo recomendações do fabricante.

A integridade do RNA extraído foi avaliada via eletroforese, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e a qualidade foi analisada em espectrofotômetro NanoDrop 1000 UV (Thermo Fisher Scientific®).

Sequenciamento do RNA

Para o sequenciamento das amostras, foi utilizada a plataforma Illumina e oito bibliotecas de cDNA foram sintetizadas, correspondentes aos tratamentos CT (sempre irrigado), T3 (3 dias sem água), T6 (6 dias sem água) e RS (reidratado após 6 dias sem água), sendo uma amostra para cada clone, VM01 e VM05.

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), utilizando o sistema Illumina HiSeq 2500, modo *pair end* 2 x 100 pb.

Processamento dos dados

As leituras obtidas tiveram a qualidade verificada no *software* FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Em seguida, possíveis contaminantes foram identificados nas amostras, através do *software* FastQScreen (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq_screen/).

Para mapeamento foi utilizado como referência o genoma da espécie *E. grandis* (MYBURG et al., 2014), disponível na plataforma *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>), através do *software* STAR (DOBIN et al., 2013), utilizando as configurações padrão. Para remoção das duplicações, foi utilizada a ferramenta MarkDuplicate do *software* Picard (<https://broadinstitute.github.io/picard/>).

De acordo com o total de *reads* (leituras), em TPM (transcritos por milhão), os dados foram normalizados pelo tamanho de cada biblioteca (WAGNER; KIN; LYNCH, 2012). Em seguida, foi feita uma nova normalização, de acordo com a distribuição dos *reads*, para evitar que genes com alta expressão, em relação aos demais, subestimasse a expressão dos demais genes. Todas essas normalizações foram feitas com o pacote EdgeR (CHEN; LUN; SMYTH, 2016), do *software* R (<https://bioinformatics-core-shared-training.github.io/RNAseq-R/>).

As análises globais, feitas para fornecer um panorama geral das bibliotecas, também foram feitas com o pacote EdgeR. O *heatmap*, para avaliação da expressão gênica relativa dos 100 genes mais expressos nas bibliotecas foi gerado na plataforma Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/expression/>).

Análise de genes diferencialmente expressos (GDE's)

Os dados normalizados foram submetidos à análises estatísticas através do pacote NOISeq (TARAZONA et al., 2015) do *software* R (LIM; LEE; KIM, 2017), onde uma característica foi considerada diferencialmente expressa quando a relação de \log_2 entre duas condições e o valor de diferença entre as duas condições correspondentes foram mais altas do que o ruído ($q = 0,9$). A distribuição de ruído foi obtida comparando todos os pares de repetições dentro da mesma condição. Todas as imagens geradas pela distribuição dos genes foram obtidas utilizando o mesmo *software*.

Análises de enriquecimento funcional

A análise de enriquecimento da ontologia genética (GO) foi baseada na ferramenta disponível no banco de dados BLAST2GO (CONESA; GOTZ, 2008), utilizando as configurações padrão.

A construção da rede de correlação dos fatores de transcrição foi feita com uso dos genes diferencialmente expressos (GDE's), obtidos no NOISEq. Estes genes foram submetidos à plataforma PlantTFDB v4.0 (*Plant Transcription Factor Database*) (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/family.php?fam=bHLH>), para identificação dos possíveis fatores de transcrição. A rede foi construída através da ferramenta Cytoscape (SHANNON et al., 2003). Com base no número de conexões obtidas para cada fator de transcrição, foi feita uma nova rede de correlação com os 10 fatores de transcrição que apresentaram maior número de conexões (Top 10 *betweenness*), utilizando o pacote cytoHubba (CHIN et al., 2014) do Cytoscape.

Para verificar a distribuição total dos genes, 24 características, envolvidas com respostas ao déficit hídrico e que tiveram mais genes associados, foram selecionadas, de acordo com seu domínio conservado, disponível no *Phytozome*. Os resultados foram plotados em gráficos de distribuição em barra, para cada uma das bibliotecas, utilizando o pacote NOISEq do *software* R.

Devido à importância do ácido abscísico (ABA) nas respostas ao déficit hídrico, o perfil de expressão relativa dos genes regulatórios desse fitormônio foi gerado para condições normais (sem estresse) e para as condições de déficit hídrico impostas aos clones VM01 e VM05 (tratamentos). Os resultados foram expressos em *heatmaps*, que compararam genes da biossíntese, transporte e degradação de ABA. Para obtenção do perfil de expressão destes genes em *Eucalyptus* foi utilizado o banco de dados públicos disponível na plataforma Eucgenie.org (<https://eucgenie.org>), com desenvolvimento do *heatmap* nas nove bibliotecas de *E. grandis* disponíveis (*E. grandis* Tissues exAtlas). Para obtenção dos *heatmaps* que mostravam a expressão dos genes selecionados nos tratamentos de déficit hídrico impostos, entre os clones VM01 e VM05, foram utilizados os valores de expressão em TPM e a plataforma Heatmapper. Os genes selecionados foram apenas aqueles relacionados aos processos de biossíntese, transporte e degradação de ABA e estavam entre os GDE's obtidos do pacote NOISEq (tópico anterior).

Dois mapas metabólicos, envolvidos com a fotossíntese, processo altamente afetado pelo déficit hídrico, também foram construídos com base nos GDE's. A determinação das

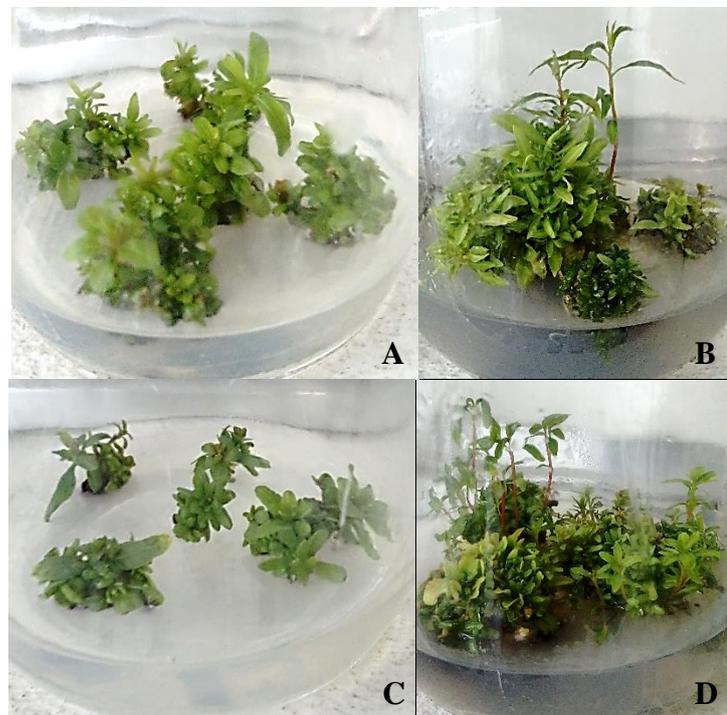
enzimas envolvidas, em cada uma das rotas selecionadas, foi determinada através de alinhamentos dos genes com o banco de dados KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>).

RESULTADOS

Aclimatização das plântulas obtidas *in vitro*

Quanto ao processo de micropropagação, não foi observada diferença entre os clones VM01 e VM05. Ambos multiplicaram, alongaram e enraizaram bem e em tempos similares (FIGURA 1.2).

Figura 1.2 – Fotografia dos clones VM01 e VM05 em condições *in vitro*.



Legenda: (A, B) Clone VM01 em meio de multiplicação e alongamento, respectivamente; (C, D) Clone VM05 em meio de multiplicação e alongamento, respectivamente.

Foto: Do autor (2018).

Para os dois clones, aproximadamente 87% das mini estacas obtidas no meio de alongamento conseguiram enraizar; entretanto, o crescimento da parte aérea não foi uniforme.

Na casa de vegetação, todas as plantas enraizadas foram transferidas para bandejas. Para transplântio nos copos plásticos, foram selecionadas 120 plantas de cada clone, com base no tamanho, visando obter a maior homogeneidade possível no processo. Nessa etapa a taxa de

mortalidade foi aproximadamente 1% e 96 plantas de cada clone foram selecionadas e divididas entre os tratamentos (FIGURA 1.3).

Figura 1.3 – Fotografia dos clones VM01 e VM05 divididos em quatro blocos, antes do início do déficit hídrico.

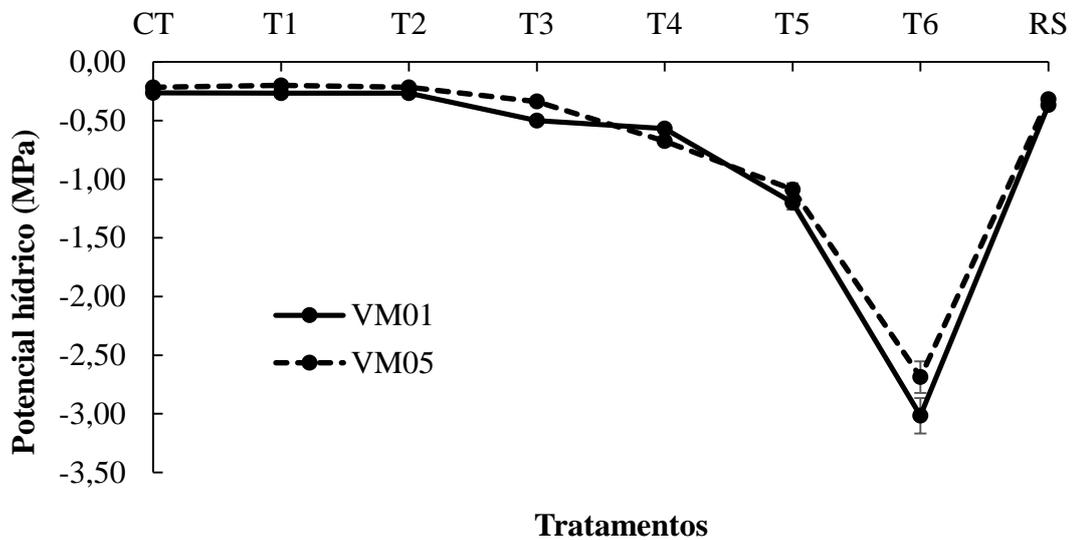


Foto: Do autor (2018).

Estabelecimento do estresse e coleta de dados

Após os dias de estresse e o período de reidratação do tratamento RS (TABELA 1.1), os dados coletados foram analisados em planilhas do Microsoft Excel[®] e utilizados como padrão para escolha das amostras que seriam sequenciadas. Um dos parâmetros considerados foi o potencial hídrico (GRÁFICO 1.1). Com base nesses dados, foram selecionadas, para os dois clones, amostras dos tratamentos CT (sempre irrigado), T3 (3 dias de estresse), T6 (6 dias de estresse) e RS (6 dias de estresse + 2 dias de irrigação) para extração de RNA e posterior sequenciamento.

Gráfico 1.1 – Potencial hídrico foliar dos clones VM01 e VM05 após imposição dos tratamentos de estresse.



Legenda: CT (controle) = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS (resiliência) = 6 dias de estresse + 2 dias de irrigação. Potenciais hídricos entre -1,5 e -2,0 Mpa são considerados indicativos de déficit hídrico para a maioria das culturas (TAIZ et al., 2017).

Os valores de potencial hídrico nos diferentes tratamentos ajudam a compreender o *status* hídrico das plantas à medida que ocorre redução na disponibilidade de água. Plantas dos clones VM01 e VM05 sempre irrigadas (CT) e que ficaram até dois dias sem água (T2) não alteraram seu potencial hídrico. A partir do terceiro dia de estresse (T3), esses valores começaram a reduzir em todas as plantas, sendo que esta queda é um pouco mais acentuada em plantas do clone VM01. Esse padrão é invertido a partir do T4, quando o potencial hídrico do clone VM01 se mantém e o do clone VM05 reduz pela metade, em relação ao tratamento T3. A partir do quarto dia de déficit hídrico (T4) os valores voltam a cair para os dois clones, até o último dia de estresse (T6). Neste tratamento, o potencial hídrico das plantas VM01 é menor que nas plantas VM05. Com a reidratação (RS), os valores voltam à serem similares para os dois clones e mantêm-se próximos aos valores de plantas que não passaram pelo déficit hídrico (CT). Esses dados estão de acordo com os demais dados fisiológicos coletados (dados não mostrados), onde as maiores variações entre os tratamentos começam a ser observadas entre o terceiro e o quarto dia de déficit hídrico (T3 e T4, respectivamente).

A escolha das amostras a serem sequenciadas também foi baseada na análise visual das plantas, para comparar a fenologia das plantas com os dados obtidos (FIGURA 1.4).

Figura 1.4 – Fotografias dos clones VM01 e VM05 após a imposição dos tratamentos selecionados.



Legenda: **(A)** VM01 CT; **(B)** VM01 T3; **(C)** VM01 T6; **(D)** VM01 RS; **(E)** VM05 CT; **(F)** VM05 T3; **(G)** VM05 T6; **(H)** VM05 RS. CT (controle) = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS (resiliência) = 6 dias de estresse + 2 dias de irrigação.

Fonte: Do autor (2018).

Observando as imagens da Figura 1.4, é possível observar que a diferença entre os clones é mais acentuada no déficit hídrico mais severo (T6), sendo que o clone VM05 aparenta estar sentindo mais os efeitos do déficit hídrico nessa fase, pois as folhas estão mais murchas e o ápice caulinar mais curvado, em comparação com a planta do clone VM01. Ao observar as plantas do tratamento RS é possível inferir que a recuperação de ambos os clones após o déficit hídrico é possível, entretanto, o clone VM05 mantém as folhas mais murchas que o clone

VM01, indicando que este clone pode se recuperar mais rápido do estresse do que aquele ou que a sua recuperação foi mais rápida pois este estava sofrendo menos com a falta de água.

Análises globais do sequenciamento

Para caracterizar o transcriptoma dos dois clones de eucalipto (VM01 e VM05), submetidos a diferentes intensidades de déficit hídrico, foram construídas quatro bibliotecas de cDNA de cada um dos clones. As bibliotecas equivalem aos tratamentos CT (plantas irrigadas), T3 (3 dias de estresse), T6 (6 dias de estresse) e RS (6 dias de estresse, seguidos por dois dias de irrigação). Cada umas dessas bibliotecas geraram *reads* com características específicas, apresentadas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 – Características gerais dos dados de RNA-Seq obtidos em cada biblioteca.

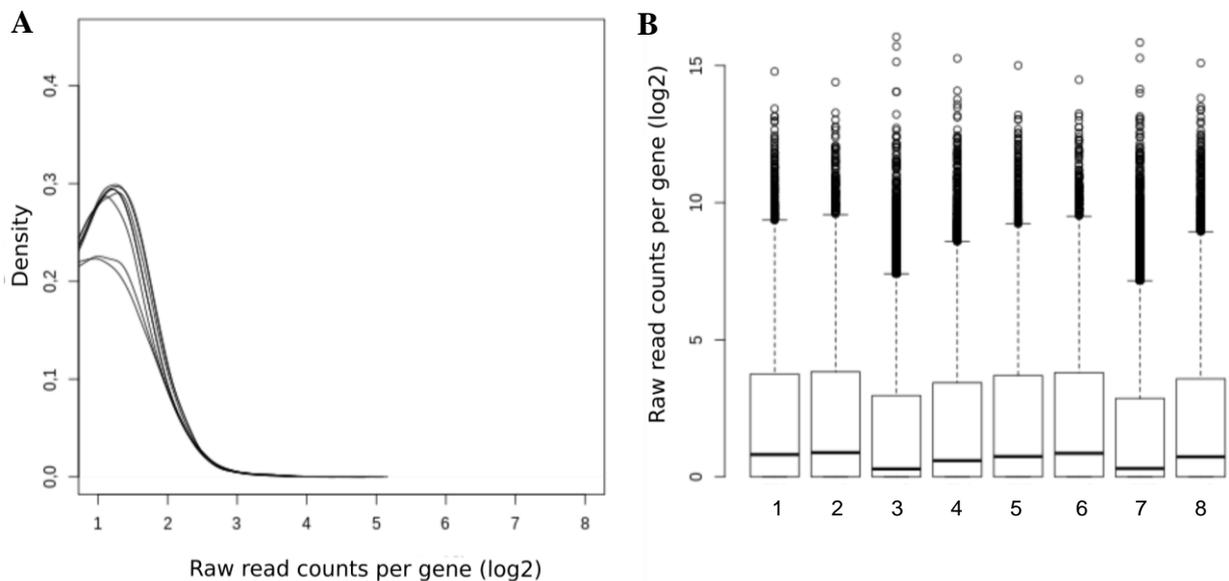
BIBLIOTECAS CARACTERÍSTICAS	1	2	3	4	5	6	7	8
	Número inicial de <i>reads</i>	39413902	34580646	36046453	36795513	36935866	34741214	35229260
Média do tamanho do <i>read</i>	202	202	202	202	202	202	202	202
<i>Reads</i> únicos								
% de <i>reads</i> únicos mapeados	84.65%	84.99%	81.62%	81.83%	84.66%	85.70%	80.72%	84.51%
% de não alinhamento por base do <i>read</i>	1.00%	1.00%	1.05%	0.99%	0.99%	1.01%	1.06%	0.99%
% deleção por base do <i>read</i>	0.05%	0.05%	0.07%	0.05%	0.05%	0.05%	0.07%	0.05%
% inserção de base do <i>read</i>	0.04%	0.04%	0.04%	0.03%	0.03%	0.04%	0.04%	0.03%
<i>Reads</i> mapeados em múltiplos loci								
% de <i>reads</i> mapeados em múltiplos loci	5.73%	5.22%	8.03%	7.05%	5.63%	5.25%	9.27%	5.39%
<i>Reads</i> não mapeados								
% de <i>reads</i> : Muitos <i>mismatches</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
% de <i>reads</i> : muito curtos	9.58%	9.75%	10.27%	11.08%	9.68%	9.01%	9.92%	10.07%
% de <i>reads</i> : outros motivos	0.02%	0.02%	0.06%	0.01%	0.02%	0.02%	0.07%	0.02%

Legenda: **1-4:** clone VM01; respectivamente CT, T3, T6 e RS. **5-8:** clone VM05; respectivamente CT, T3, T6 e RS. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

O resultado do sequenciamento gerou entre 34 e 39 milhões de *reads pair-end* em cada uma das oito bibliotecas analisadas e todas atenderam os critérios de qualidade gerados pelo *software* FastQC. As análises de possíveis contaminantes pelo *software* FastQ *Screen* não revelaram contaminações nas amostras.

Para identificar anormalidades na distribuição dos *reads* nas bibliotecas foi feito um gráfico de densidade de distribuição de *reads* por gene (log) (GRÁFICO 1.2 – A). Este é um modo de comparar as bibliotecas, por sobreposição, e identificar aquelas que apresentam uma distribuição diferente. Para visualizar este comportamento de maneira isolada, em cada biblioteca, a distribuição foi apresentada também na forma de *boxplots* (GRÁFICO 1.2 – B).

Gráfico 1.2 – Densidade de distribuição de *reads* total por gene (log) em cada biblioteca.

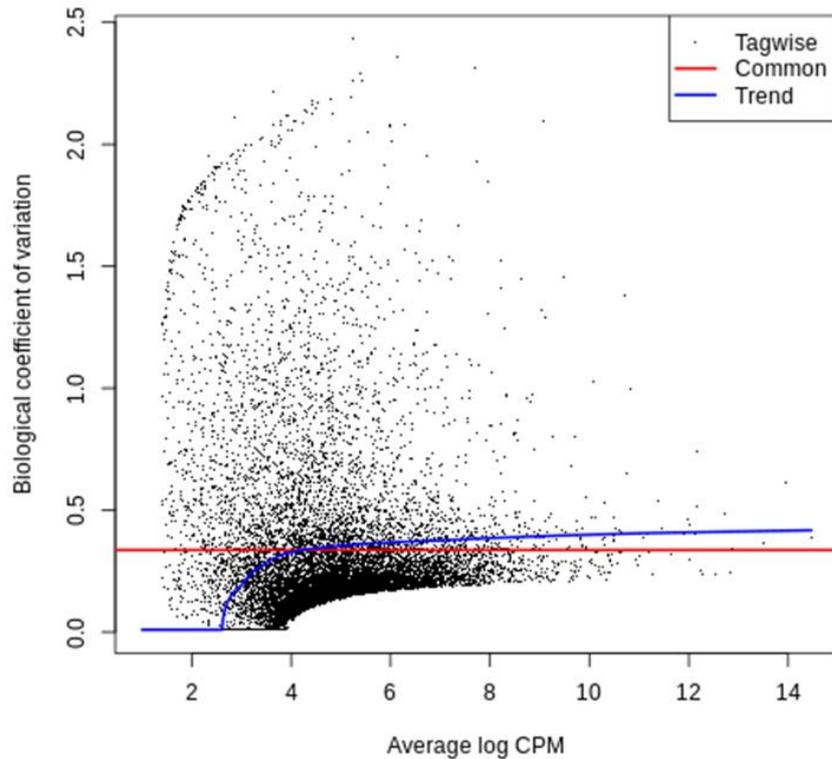


Legenda: **(A)** Gráfico de densidade de distribuição; **(B)** Gráfico da contagem de *reads* por gene em cada uma das bibliotecas. **1-4:** clone VM01; respectivamente CT, T3, T6 e RS. **5-8:** clone VM05; respectivamente CT, T3, T6 e RS. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

Ao analisar estes gráficos, não é esperado que a distribuição seja idêntica, mas que apresente um comportamento similar. Isto é observado nas bibliotecas 3 e 7, que são as que apresentam a maior discrepância entre as demais. Provavelmente isso se deve à severidade do déficit hídrico nestes pontos, situação em que as plantas tendem a diminuir o processo transcricional para economizar energia.

A variabilidade da expressão gênica entre as bibliotecas está representada no Gráfico 1.3.

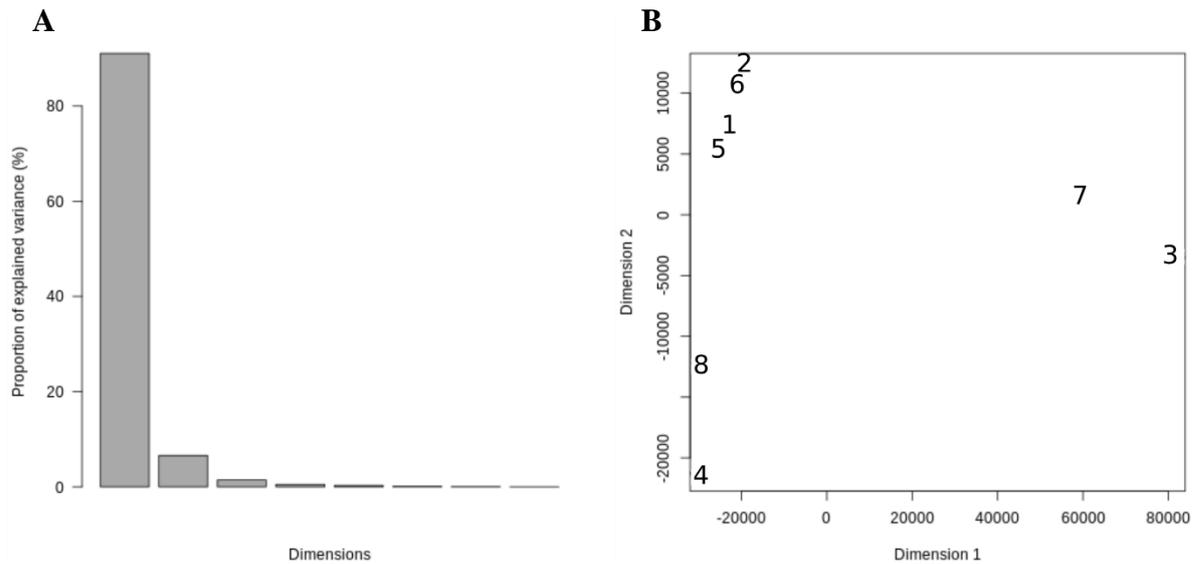
Gráfico 1.3 – Variação no coeficiente biológico (*Biological coefficient of variation* – BCV) em relação ao log2 do número de *counts* por milhão (CPM).



As variações no coeficiente biológico (BCV) representam a variabilidade da expressão gênica após a remoção da variabilidade de Poisson, proveniente do sequenciamento. Como observado no gráfico, a maioria dos genes apresentou BCV entre os limites considerados adequados (abaixo da linha vermelha). Uma possível explicação para os genes que estão acima desta linha é a falta de repetições biológicas entre as bibliotecas. Por exemplo, um $BCV = 0,44$ significa que a média dos valores de expressão variaram 44% para mais ou para menos entre as bibliotecas.

Para identificar as bibliotecas com perfis transcricionais semelhantes e suas relações de proximidade, foram feitos gráficos dos componentes principais de cada uma das bibliotecas analisadas (GRÁFICO 1.4).

Gráfico 1.4 – Análise dos componentes principais das bibliotecas.

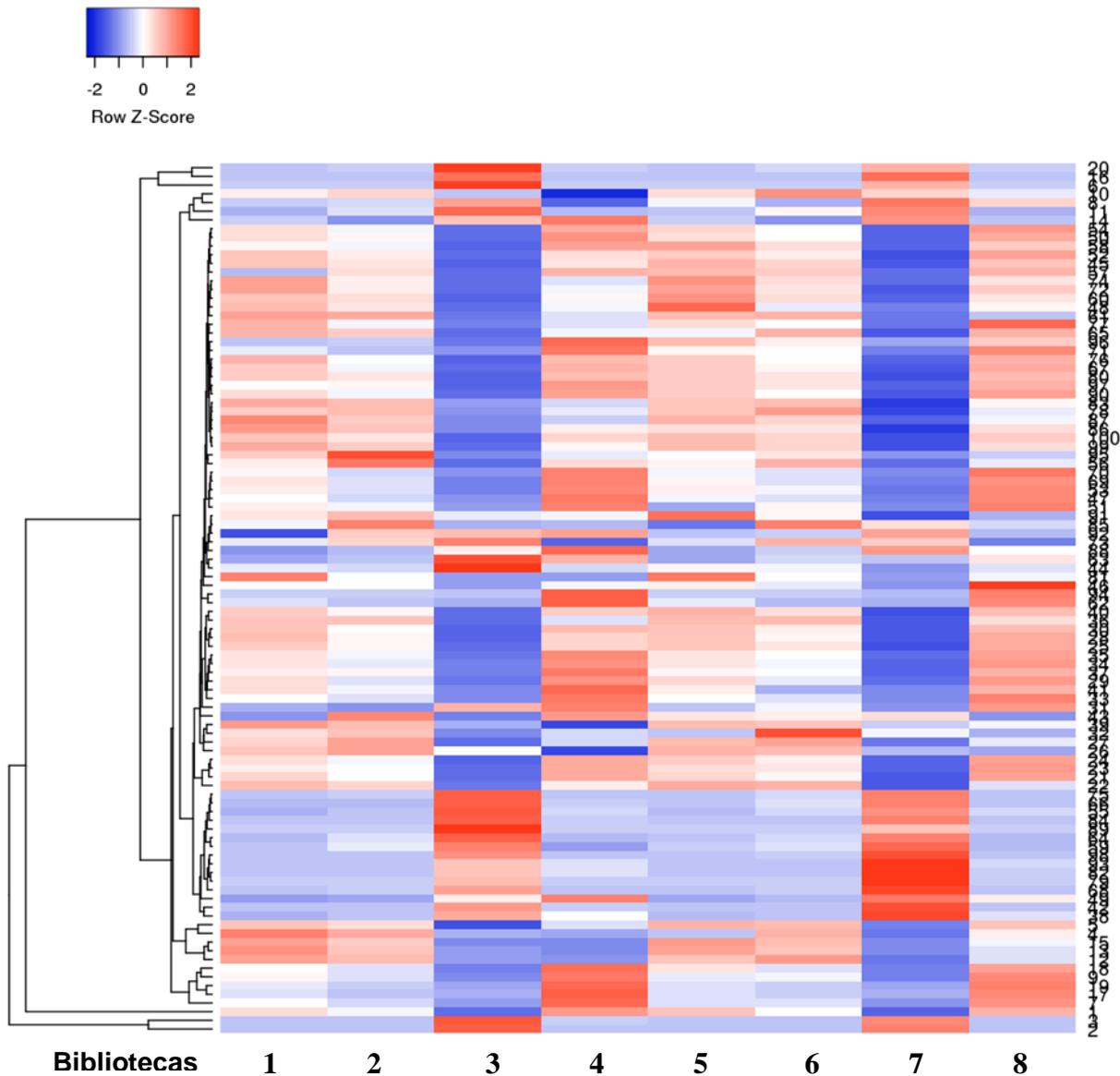


Legenda: **(A)** Matriz de dissimilaridade, apresentando quantos componentes são necessários para explicar as variações nos dados; **(B)** Distâncias das bibliotecas que correspondem a variação do coeficiente biológico (BCV). **1-4:** clone VM01; respectivamente CT, T3, T6 e RS. **5-8:** clone VM05; respectivamente CT, T3, T6 e RS. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

No Gráfico 1.4 – A, é possível observar que a primeira dimensão é responsável por explicar mais de 80% da variabilidade nas amostras. Já no Gráfico 1.4 – B, essa mesma dimensão separa as bibliotecas 3 e 7 das demais, de maneira perceptível no eixo x (dimensão 1); ao fazer essa mesma comparação no eixo y (dimensão 2), observa-se que não houve um grande distanciamento entre as demais bibliotecas. Esta dimensão demonstra uma similaridade entre os pares de bibliotecas 2:6 e 1:5, e uma proximidade entre estes mesmo pares. Ainda na segunda dimensão, há uma diferença entre as bibliotecas 8 e 4, que correspondem ao mesmo tipo de estresse mas em clones diferentes.

Como observado até o momento, as bibliotecas que estão mais discrepantes em relação às demais são aquelas que correspondem ao déficit hídrico mais severo, tanto no clone VM01 quanto no VM05. Para confirmar este padrão, foi feita uma análise da expressão dos 100 genes mais expressos nas bibliotecas (FIGURA 1.5).

Figura 1.5 – Expressão relativa dos 100 genes mais expressos nas bibliotecas analisadas.



Legenda **1-4**: clone VM01; respectivamente CT, T3, T6 e RS. **5-8**: clone VM05; respectivamente CT, T3, T6 e RS. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação. As diferenças na expressão gênica são observadas ao se comparar os genes dentro de uma mesma linha.

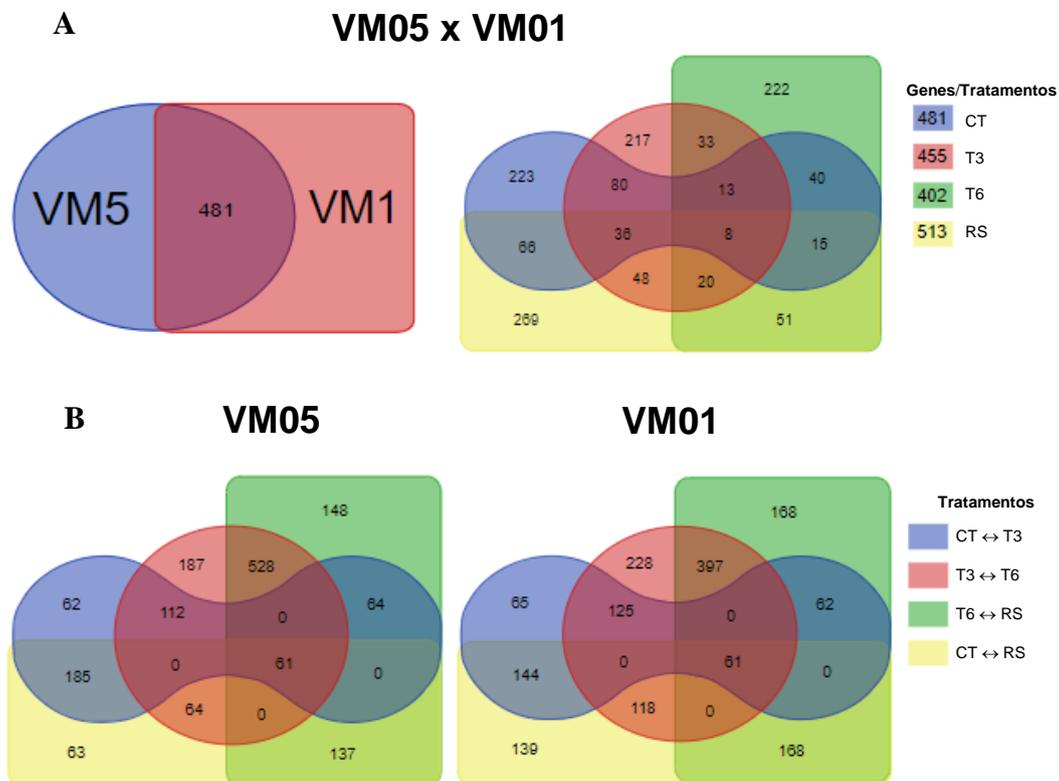
É possível observar que as variações na expressão gênica foram mais acentuadas no sexto dia de déficit hídrico (bibliotecas 3 e 7). Nestes pontos, a maioria dos genes teve sua expressão reprimida. Já os genes que foram positivamente regulados pelo estresse, ou seja, que aumentaram sua expressão em resposta ao déficit hídrico, fizeram isso de maneira bem acentuada, em comparação com os demais tratamentos avaliados. Diferenças na expressão também podem ser observadas nas bibliotecas 4 e 8, que correspondem às plantas que foram reidratadas após o déficit hídrico. Neste caso, muitos genes que foram reprimidos pelo estresse

severo voltaram a ser expressos, em proporções superiores àsquelas observadas em plantas que não passaram pelo estresse ou que ficaram apenas três dias sem água.

Genes diferencialmente expressos (GDE's)

As bibliotecas geradas pelo sequenciamento foram mapeadas contra o genoma de *E. grandis*, resultando na identificação de 481 GDE's, quando comparados os clones VM01 e VM05, em todas as bibliotecas sequenciadas (FIGURA 1.6).

Figura 1.6 – Diagrama de Venn mostrando o padrão de distribuição dos genes diferencialmente expressos entre os tratamentos e entre os clones VM01 e VM05.



Legenda: **(A)** Genes diferencialmente expressos (GDE's), identificados ao comparar os clones VM01 e VM05, em todas as bibliotecas sequenciadas. À esquerda, observa-se o número total de GDE's em todos os tratamentos; à direita, os GDE's entre os dois clones, em cada comparação das bibliotecas. **(B)** GDE's em cada clone, entre cada biblioteca comparada. Genes em comum em cada comparação são demonstrados pelas interseções. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

Ao comparar os clones VM01 e VM05, observa-se que, entre as plantas do tratamento CT, também foram encontrados 481 GDE's e que esse número reduziu à medida que os dias

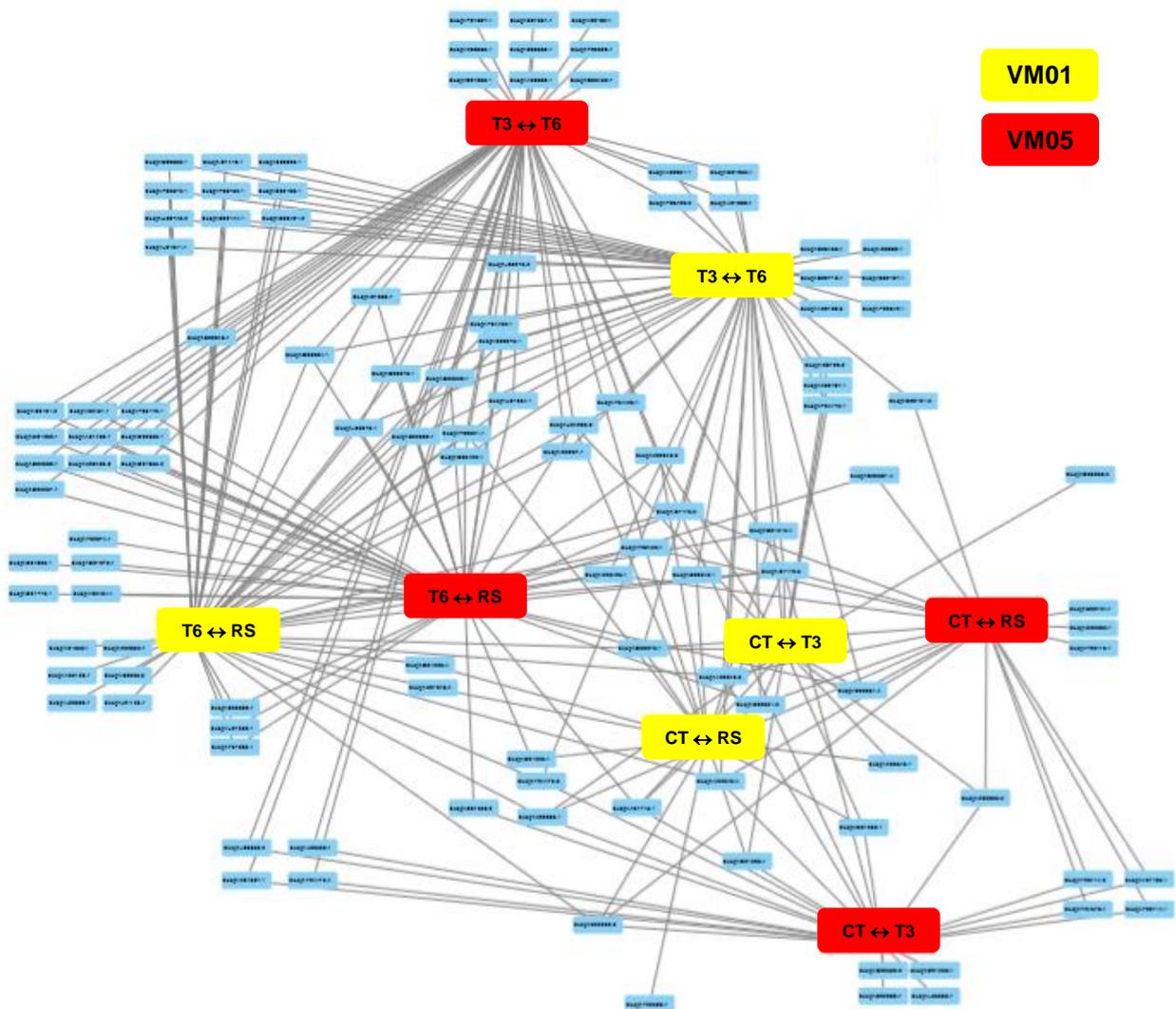
sem água avançavam. Com o reestabelecimento da água, nas plantas do tratamento RS, esse número aumentou, sendo encontrados 513 GDE's entre os clones (FIGURA 1.6 – A).

A Figura 1.6 – B, mostra os GDE's em cada biblioteca sequenciada, mas em comparação com as plantas do mesmo clone. Entre as plantas do clone VM05, foram encontrados 484 GDE's entre as plantas dos tratamentos CT e T3, 952 GDE's entre T3 e T6, 938 GDE's entre T6 e RS e 510 entre CT e RS. Já para as plantas do clone VM01, foram encontrados 457 GDE's entre as plantas dos tratamentos dos tratamentos CT e T3, 929 GDE's entre T3 e T6, 856 GDE's entre T6 e RS e 630 entre CT e RS.

Rede de correlação dos fatores de transcrição

As análises de correlação identificaram 83 genes do clone VM01 e 74 genes do clone VM05 associados à diversos de fatores de transcrição, em um total de 260 conexões. No clone VM01 foram identificadas 25 famílias de fatores de transcrição e no clone VM05, 24 (FIGURA 1.7; TABELA 1.4).

Figura 1.7 – Rede de correlação dos fatores de transcrição identificados após a comparação das bibliotecas sequenciadas, para os clones VM01 e VM05.



Legenda: Retângulos maiores correspondem às condições que ativaram os fatores de transcrição e as setas entre as bibliotecas indicam que a comparação foi feita entre elas. Retângulos pequenos, em azul, equivalem aos fatores de transcrição identificados. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

Tabela 1.4 – Fatores de transcrição identificados com a comparação dos tratamentos, nos clones VM01 e VM05, agrupados de acordo com a família.

FAMÍLIAS	FATORES DE TRANSCRIÇÃO						N° DE FATORES IDENTIFICADOS
	VM01			VM05			
AP2	-			Eucgr.I00892.1			31
ARF	Eucgr.G00076.1			Eucgr.G00076.1	Eucgr.G00076.1	Eucgr.K02197.1	33
	Eucgr.G00076.1			Eucgr.K02197.1	Eucgr.G00076.1	Eucgr.G00076.1	
ARR-B	Eucgr.C00380.2			-			9
B3	Eucgr.B02808.1	Eucgr.B02808.1	Eucgr.G01238.1	Eucgr.B02808.1	Eucgr.G01238.1	Eucgr.G01238.1	97
				Eucgr.B02808.1	Eucgr.F02399.1		
BBR-BPC	Eucgr.E01260.1	Eucgr.E01260.1		-			7
bHLH	Eucgr.B00048.1	Eucgr.B01226.1	Eucgr.A02043.3	Eucgr.A02043.3	Eucgr.I01936.1	Eucgr.E00273.1	178

	Eucgr.B03420.1	Eucgr.B03420.1	Eucgr.A02043.4	Eucgr.A02043.4	Eucgr.A02043.3	Eucgr.H00748.2	
	Eucgr.D02287.1	Eucgr.D02287.1	Eucgr.A02043.3	Eucgr.B03420.1	Eucgr.A02043.4	Eucgr.I01936.1	
	Eucgr.E00273.1	Eucgr.E00273.1	Eucgr.A02043.4	Eucgr.E00273.1	Eucgr.B00048.1	Eucgr.B01226.1	
	Eucgr.I01936.1	Eucgr.I01936.1		Eucgr.H00748.2	Eucgr.B03420.1		
bZIP		Eucgr.A01499.1		Eucgr.B02198.1	Eucgr.I01416.1	Eucgr.E00223.1	88
		Eucgr.A01499.1		Eucgr.E00223.1	Eucgr.B02198.1	Eucgr.I01416.1	
C2H2	Eucgr.J02278.1	Eucgr.F00114.1	Eucgr.B02626.2	Eucgr.F03752.1	Eucgr.L01041.1	Eucgr.J02278.1	125
	Eucgr.J02278.2	Eucgr.F00114.2	Eucgr.F00114.1	Eucgr.J02278.1	Eucgr.B02626.2	Eucgr.L01041.1	
	Eucgr.J02278.1	Eucgr.F04379.1	Eucgr.F00114.2	Eucgr.J02278.1	Eucgr.F03752.1	Eucgr.B02626.2	
	Eucgr.J02278.2	Eucgr.L03668.1	Eucgr.F04379.1	Eucgr.J02278.2	Eucgr.F03752.1	Eucgr.B02626.2	
	Eucgr.B02626.2						
C3H	Eucgr.D01238.2	Eucgr.D01238.2	Eucgr.B00161.2		Eucgr.B00161.2		59
	Eucgr.D01238.1						
CAMTA	Eucgr.H04035.2	Eucgr.H04035.2		Eucgr.H04035.2	Eucgr.H04035.2		7
CO-like	Eucgr.K01387.1	Eucgr.K02636.1	Eucgr.K01387.1		-		13
Dof	Eucgr.K00405.2	Eucgr.K00405.2	Eucgr.K00405.1	Eucgr.K00405.1	Eucgr.K00405.1		30
	Eucgr.K00405.1						
E2F/DP	Eucgr.J00539.1	Eucgr.J00539.1	Eucgr.J00539.2		-		9
	Eucgr.J00539.2						
ERF	Eucgr.A02830.1	Eucgr.D01775.1	Eucgr.G03094.1	Eucgr.C02719.1	Eucgr.G03094.1	Eucgr.K02952.1	136
	Eucgr.B03559.1	Eucgr.F02974.1	Eucgr.H01659.1	Eucgr.G03094.1	Eucgr.H01659.1		
	Eucgr.G03094.1						
G2-like	Eucgr.A02031.1	Eucgr.F04475.4	Eucgr.K02966.2	Eucgr.A00189.3	Eucgr.G01503.4	Eucgr.I01178.3	63
	Eucgr.F04475.4	Eucgr.F04475.5	Eucgr.I01178.2	Eucgr.A02031.1	Eucgr.I01178.2	Eucgr.K02966.1	
	Eucgr.I01178.2	Eucgr.G01503.1	Eucgr.I01178.3	Eucgr.F04475.1	Eucgr.I01178.3	Eucgr.K02966.2	
	Eucgr.I01178.3	Eucgr.I01178.2	Eucgr.K02966.1	Eucgr.F04475.5	Eucgr.K02966.1	Eucgr.G01503.1	
	Eucgr.I01178.2	Eucgr.I01178.3	Eucgr.K02966.2	Eucgr.I01178.2	Eucgr.F04475.1	Eucgr.G01503.4	
	Eucgr.I01178.3	Eucgr.K02966.1		Eucgr.I01178.3	Eucgr.G01503.1	Eucgr.I01178.3	
GRAS		-			Eucgr.G03258.3		94
HD-ZIP	Eucgr.G02520.1	Eucgr.H01254.1	Eucgr.A01715.1	Eucgr.G02520.1	Eucgr.G02520.1	Eucgr.A01715.1	52
	Eucgr.H01254.1	Eucgr.I02464.1	Eucgr.A01715.1	Eucgr.H01254.1	Eucgr.H01254.1	Eucgr.A01715.1	
	Eucgr.G02520.1						
HSF		Eucgr.C03452.1			Eucgr.C03433.1		37
LBD	Eucgr.G03078.1	Eucgr.G03078.1	Eucgr.F00115.1	Eucgr.G03078.1	Eucgr.G03078.1	Eucgr.J01123.1	37
MIKC_MADS	Eucgr.F00420.1	Eucgr.E02863.1	Eucgr.F00420.1	Eucgr.F00420.2	Eucgr.F00420.1	Eucgr.F00420.1	84
	Eucgr.F00420.2						
MYB	Eucgr.D02390.1	Eucgr.I02057.1	Eucgr.F03176.1	Eucgr.B02144.1	Eucgr.F04423.1	Eucgr.F01069.1	174
	Eucgr.E01031.1	Eucgr.C03699.1	Eucgr.G02591.4	Eucgr.B02197.1	Eucgr.I02057.1	Eucgr.F02372.1	
	Eucgr.F03176.1	Eucgr.D02390.1	Eucgr.D02099.1	Eucgr.F02372.1	Eucgr.A02150.1	Eucgr.F04422.1	
	Eucgr.F04422.1	Eucgr.F01069.1	Eucgr.G02591.4	Eucgr.F02842.1	Eucgr.B02144.1	Eucgr.F04423.1	
	Eucgr.F04423.1			Eucgr.F04422.1	Eucgr.C03699.1	Eucgr.I02057.1	
MYB_related	Eucgr.F01887.1	Eucgr.D02651.4	Eucgr.D02651.3	Eucgr.B02401.2	Eucgr.B02401.2	Eucgr.D02651.3	87
	Eucgr.I02431.1	Eucgr.I02431.1	Eucgr.D02651.4	Eucgr.D02651.3	Eucgr.J00892.1	Eucgr.D02651.4	
	Eucgr.D02651.3			Eucgr.D02651.4			
NAC	Eucgr.E01053.1	Eucgr.I00192.1	Eucgr.I00191.2	Eucgr.E01053.1	Eucgr.I00059.3	Eucgr.I00100.2	202
	Eucgr.I00191.2	Eucgr.G01075.1	Eucgr.B00724.1	Eucgr.I00100.2	Eucgr.I01958.1		
NF-YB		-		Eucgr.B00669.1	Eucgr.B00669.1		12
SBP	Eucgr.K02545.2	Eucgr.K02545.2		Eucgr.K01046.4	Eucgr.K02545.2	Eucgr.K02545.1	25
				Eucgr.K02545.1	Eucgr.K01046.4	Eucgr.K02545.2	
TALE	Eucgr.D01935.1	Eucgr.D01935.2	Eucgr.D01935.2		-		29
WOX		Eucgr.F02320.1			-		10

WRKY	Eucgr.A01990.1	Eucgr.D01605.1	Eucgr.A01195.1	Eucgr.A01990.1	Eucgr.F00621.1	Eucgr.F00621.1	102
	Eucgr.D02359.1	Eucgr.D02359.1	Eucgr.A01195.1	Eucgr.C00348.1	Eucgr.C00348.1		
	Eucgr.F00621.1						
YABBY		-		Eucgr.C01515.4	Eucgr.C01515.4	Eucgr.C01515.4	17
				Eucgr.C01515.4			

Legenda: Os fatores de transcrição repetidos na tabela indicam o número de vezes que eles apareceram nas conexões da Figura 1.7. A coluna “Nº DE FATORES IDENTIFICADOS” indica o número de total de fatores de transcrição identificados em cada família, com base no genoma de *E. grandis*, e está disponível na plataforma PlantTFDB v4.0 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/index.php?sp=Egr>).

De maneira geral, 19 famílias de fatores de transcrição identificadas foram comuns aos dois clones, apresentando pelo menos uma conexão em comum, em alguma das bibliotecas comparadas. Entre essas famílias, a NAC é a que apresenta o maior número de fatores de transcrição detectados em eucalipto (202); entretanto, nas bibliotecas avaliadas, foram identificados apenas quatro (clone VM01) e seis fatores de transcrição (VM05). Dentro os tratamentos comparados, a família que teve o maior número de fatores de transcrição identificados, em ambos os clones, foi a G2-like, seguida, pelas famílias MYB e bHLH.

A fim de caracterizar alguns fatores de transcrição identificados entre os clones, os dez que apresentaram mais conexões (FIGURA 1.7) foram separados em uma nova rede de correlação (FIGURA 1.8).

Figura 1.8 – Rede de correlação com os 10 fatores de transcrição que mais apresentaram conexões entre as bibliotecas comparadas, para os clones VM01 e VM05 (Top 10 *betweenness*).



Legenda: Retângulos maiores correspondem às condições que ativaram os fatores de transcrição e as setas entre as bibliotecas indicam que a comparação foi feita entre elas. Retângulos pequenos, ao centro, equivalem aos 10 fatores de transcrição que mais apresentaram conexões entre as bibliotecas. A cor dos retângulos varia em função do número de conexões, sendo que aquele que apresenta coloração mais intensa, contém o fator de transcrição com mais conexões. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

É possível observar que o fator de transcrição Eucgr.I01178.3 foi o que apresentou mais conexões, nos dois clones, e que elas estão relacionadas com todas os tratamentos analisados. Este fator de transcrição faz parte da família G2-like. A caracterização deste e dos demais fatores que aparecem na Figura 1.7 estão listadas na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 – Caracterização dos principais fatores de transcrição identificados nos clones VM01 e VM05 em diferentes regimes hídricos.

FATOR DE TRANSCRIÇÃO	FAMÍLIA	CARACTERIZAÇÃO	FONTE
Eucgr.I01178.3 Eucgr.I01178.2	G2-like	Regulação do desenvolvimento de cloroplastos	FITTER et al., 2002
Eucgr.G00076.1	ARF	Regulação da expressão de genes de resposta à auxina	GUILFOYLE; HAGEN, 2007
Eucgr.A02043.3 Eucgr.A02043.4 Eucgr.B03420.1	bHLH	Regulação da transcrição	TOLEDO-ORTIZ; HUG; QUAIL, 2003
Eucgr.F00420.1	MIKC-MADS	Regulação da determinação da identidade de órgãos florais	NAM et al., 2003; PARENICOVÁ et al., 2003
Eucgr.D02651.4 Eucgr.D02651.3	MYB-related	Sem caracterização definida; encontrado em folhas	KIRIK; BAUMLEIN. 1996
Eucgr.K00405.1	Dof	Regulação da síntese de proteínas armazenadoras de sementes, de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, dos mecanismos de defesa vegetal, da germinação e da regulação de células-guarda e estômatos	LJAVETZKY; CARBONERO; VICENTE-CARBAJOSA, 2003

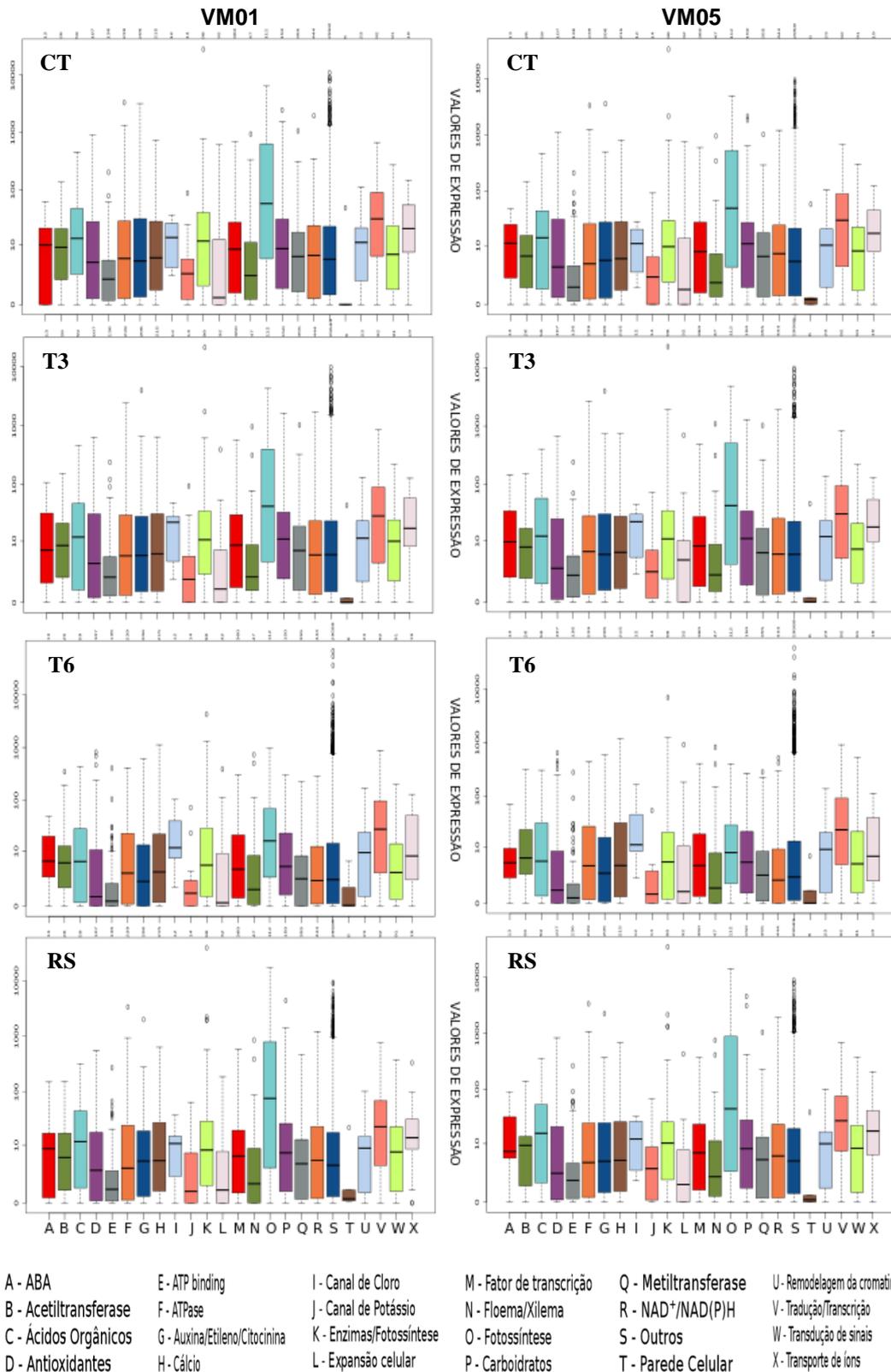
Com base no conhecimento gerado até agora sobre as famílias dos fatores de transcrição identificados nos clones VM01 e VM05, foi possível perceber que a maioria destes fatores apresenta relação com respostas já conhecidas ao déficit hídrico, principalmente aquele pertencente à família Dof, que está mais bem caracterizado. Outras famílias, como bHLH e MYB-related ainda requerem mais estudos sobre os processos nos quais estão envolvidas, principalmente aqueles relacionados ao estresse.

Distribuição geral dos genes

No genoma do eucalipto já foram identificados 36.349 genes e uma parte deles já tem função conhecida, disponível para busca na plataforma *Phytozome*. Com base nos bancos de

dados e na expressão dos genes identificados nas bibliotecas, 24 características foram selecionadas, com base no domínio conservado, para análise das variações das suas expressões em cada uma das bibliotecas. A seleção foi baseada no número de genes associados à cada característica e no seu envolvimento, direto ou indireto, nas respostas ao déficit hídrico. As variações na expressão gênica podem ser observadas na Figura 1.9.

Figura 1.9 – Padrão de distribuição dos genes em plantas dos clones VM01 e VM05 em diferentes condições de déficit hídrico, com base no domínio conservado.



Legenda: Barras menores indicam que a expressão dos genes está mais homogênea/similar e barras maiores indicam que a expressão está mais discrepante entre os genes do grupo. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

A divisão dos grupos foi baseada em processos gerais nos quais os genes podem estar envolvidos, em resposta ao déficit hídrico. Alguns grupos, menos específicos, foram agrupados dessa maneira pois estão envolvidos em diversas rotas ou processos. Entre eles, o grupo C (Ácidos orgânicos), que engloba genes e enzimas envolvidos com biossíntese e distribuição de compostos como malato, piruvato e fumarato; o grupo H (Cálcio), que envolve proteínas dependentes de cálcio, envolvidas na transdução de sinais, e íons cálcio envolvidos no fechamento estomático; o grupo P (Carboidratos), que contém genes relacionados com vários carboidratos, seja na biossíntese, transporte ou degradação; e o grupo X (Transporte de íons), que relaciona demais íons presentes nas células, sem identificação específica, ou envolvidos em processos que não tem relação direta com a fotossíntese. O grupo S (Outros) engloba genes com funções não associadas às respostas já conhecidas ao déficit hídrico ou genes que ainda não tem função definida.

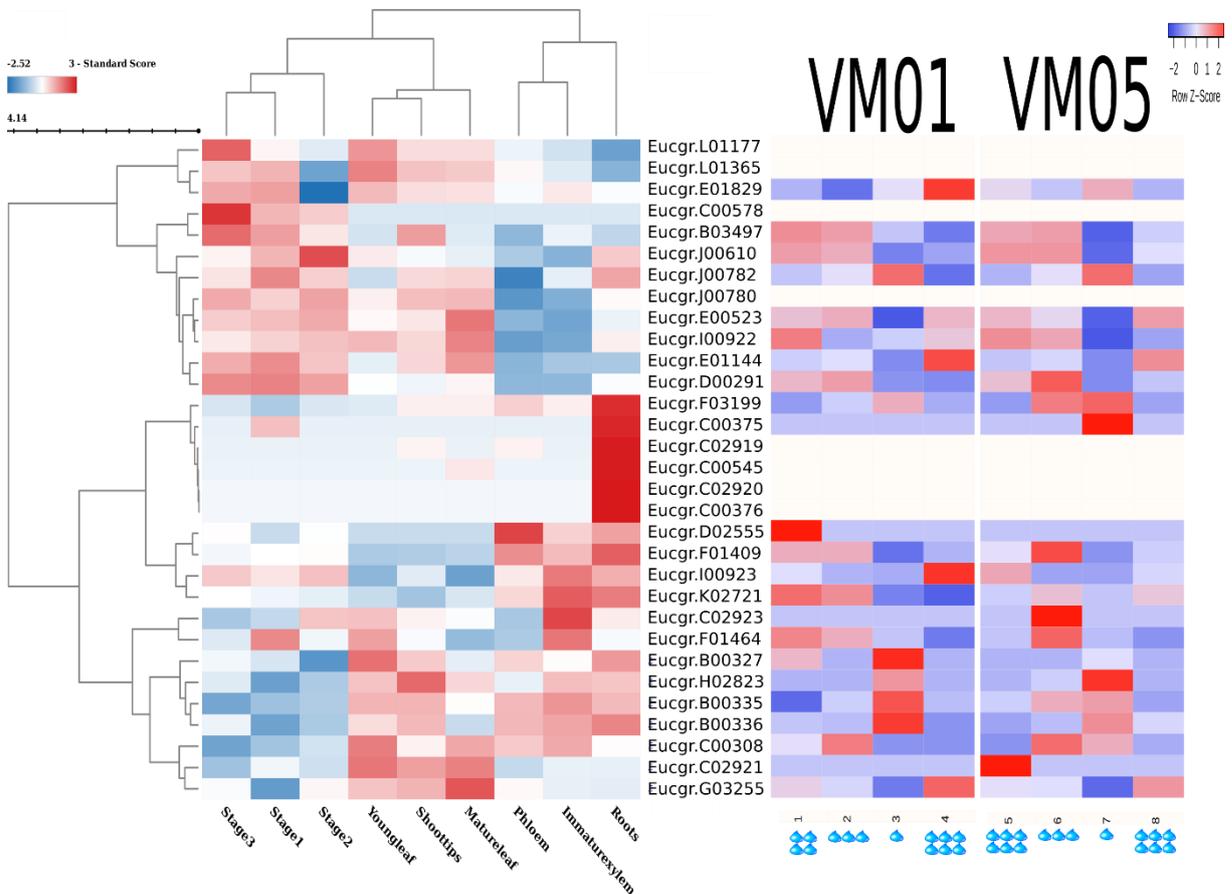
Na Figura 1.9 é possível observar que algumas características variaram mais a expressão do que outras. Comparando as plantas do clone VM01 nos diferentes tratamentos, os grupos de genes que mais variaram a expressão foram ABA (A), Antioxidantes (D), Canal de potássio (J), Fotossíntese (O), Transdução de sinais (W) e Transporte de íons (X). Já no clone VM05, as variações foram mais acentuadas nos grupos ABA (A), Acetiltransferase (B), Antioxidantes (D), ATP *binding* (E), Canal de Potássio (J), Fotossíntese (O) e Transporte de íons (X). Ao comparar as plantas do mesmo tratamento, mas de clones diferentes, os padrões de expressão variaram pouco, com diferença mais acentuada no grupo de genes relacionados ao ABA (A).

Dinâmica e distribuição de ABA

Com base no padrão de distribuição dos genes, obtido anteriormente, e na importância do ABA como mensageiro e regulador das respostas ao déficit hídrico, foi definido o padrão de expressão relativa dos genes envolvidos na sua regulação, em condições normais de desenvolvimento e em condições estressantes. Em condições não estressantes, o perfil de expressão foi avaliado em nove tecidos diferentes: tecidos vasculares (*phloem*, *immature xylem*), parte aérea (*youngleaf*, *matureleafs*, *shoottips*), raiz (*roots*) e estágios de formação de flores (*stage 1*, *stage 2*, *stage 3*; definidos por VINING et al., 2015). Além disso, os genes foram agrupados de acordo com a correlação gênica e com os tecidos avaliados.

O perfil de distribuição da expressão dos 31 genes relacionados à biossíntese do ABA, identificados em eucalipto, está apresentado na Figura 1.10.

Figura 1.10 – Expressão relativa dos genes relacionados à biossíntese de ABA.



Legenda: À esquerda, o *heatmap* apresenta a expressão dos genes em condições normais (não estressantes); à direita, apresenta nas condições impostas pelos tratamentos, em tecidos foliares dos clones VM01 e VM05. **1-4**: respectivamente CT, T3, T6 e RS do clone VM01; **5-8**: respectivamente CT, T3, T6 e RS do clone VM05. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação. As diferenças na expressão gênica são observadas ao se comparar os genes dentro de uma mesma linha.

Nesta figura, observa-se que, em condições não estressantes, cada gene apresenta expressão mais acentuada em um tecido específico, sendo que os valores mais altos normalmente são encontrados em raízes. Ao comparar os dois *heatmaps*, vemos que os genes expressos nas raízes, em condições não estressantes, têm expressão muito baixa nos demais tecidos e que, nas condições de déficit hídrico impostas, essa expressão é praticamente inexistente em tecidos foliares.

Como apenas amostras de tecidos foliares foram sequenciadas, as comparações entre condições normais e estressantes foram restritas a estes tecidos. Dentre os nove tecidos disponíveis para comparação, o *Youngleaf* é o mais próximo do material sequenciado. Em condições normais, metade dos genes relacionados à biossíntese de ABA encontrados em eucalipto, têm expressão elevada em folhas jovens. Ao comparar com os tratamentos impostos

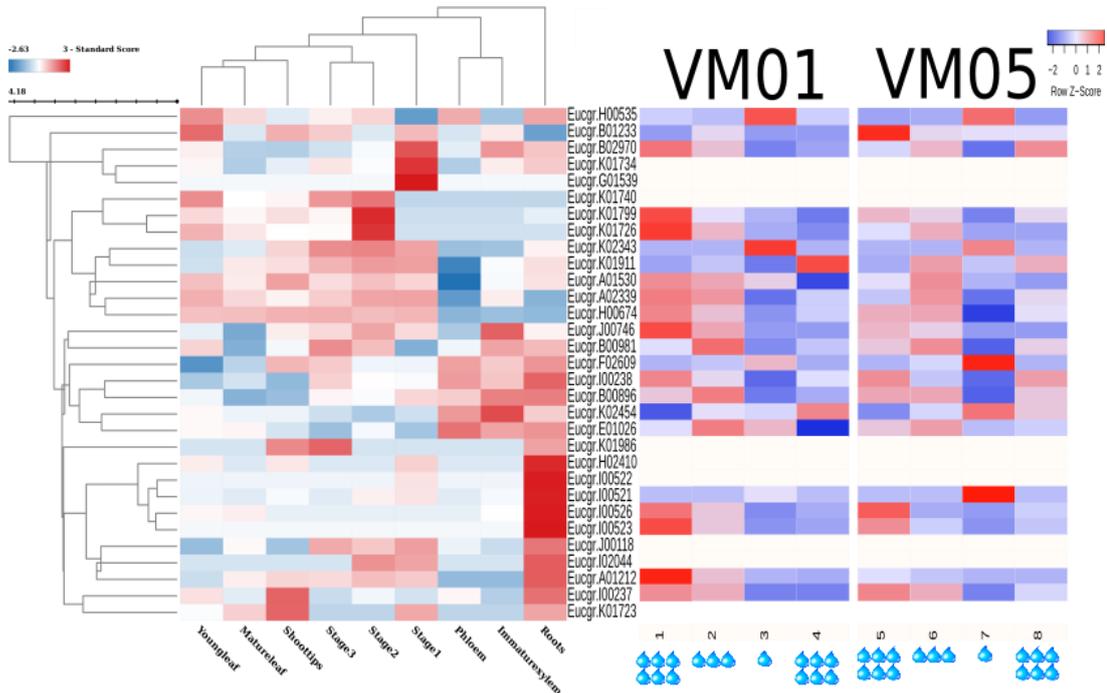
aos clones VM01 e VM05, observa-se que, em condições de déficit hídrico, a maioria dos genes altera seu padrão de expressão.

Alguns desses genes, relacionados à biossíntese do ABA, podem não ter expressão induzida pelo déficit hídrico, motivo pelo qual alguns não variaram sua expressão nestas condições. Entretanto, certos genes podem ser destacados por terem modulado sua expressão de acordo com a disponibilidade de água e também por apresentarem diferenças de expressão entre os clones.

O gene *Eucgr.I00922* aumentou a expressão tanto em dias de déficit hídrico quanto no suprimento de água (RS), dependendo do clone observado. Alguns genes foram expressos apenas em condições específicas, como *Eucgr.E001144*, mais expresso apenas na RS; *Eucgr.F03199*, expresso apenas no estresse, mas em dias diferentes entre os clones; e *Eucgr.I00923*, expresso apenas na RS do clone VM01 e no CT do VM05. Em contrapartida, outros genes aumentaram sua expressão em apenas um dos clones, como *Eucgr.I00923*, expresso apenas na RS do clone VM01; *Eucgr.C00375* e *Eucgr.H02823*, expressos no clone VM05 aos seis dias de déficit hídrico (T6); e *Eucgr.B00336* e *Eucgr.B00327*, expresso no clone VM01 no T6. O gene *Eucgr.D02555*, apresentou expressão elevada apenas nas plantas VM01 que não passaram por estresse (CT); nos demais tratamentos e nas plantas VM05, a expressão deste gene não foi detectada, o que leva à hipótese de que ele é regulado negativamente pelo déficit hídrico, pelo menos nas plantas do clone VM01.

Quanto aos transportadores de ABA, também foram identificados 31 genes em eucalipto, com expressão mais concentrada nas raízes, em condições normais (FIGURA 1.11). Nas condições impostas pelos quatro tratamentos, nos clones VM01 e VM05, observa-se que a expressão mais alta da maioria dos genes, em tecidos foliares, ocorreu nas plantas que não estavam sob estresse (CT) ou estavam no início dele (T3). Alguns genes, como *Eucgr.H00535*, *Eucgr.K002343* e *Eucgr.F02609*, aumentaram sua expressão apenas sob condições de déficit hídrico severo (seis dias de déficit hídrico – T6), indicando que ela é regulada positivamente pelo estresse, em intensidades diferentes entre VM01 e VM05. Um dos genes identificados, o *Eucgr.I00521*, teve alta expressão apenas no último dia de estresse (T6) e apenas no clone VM05.

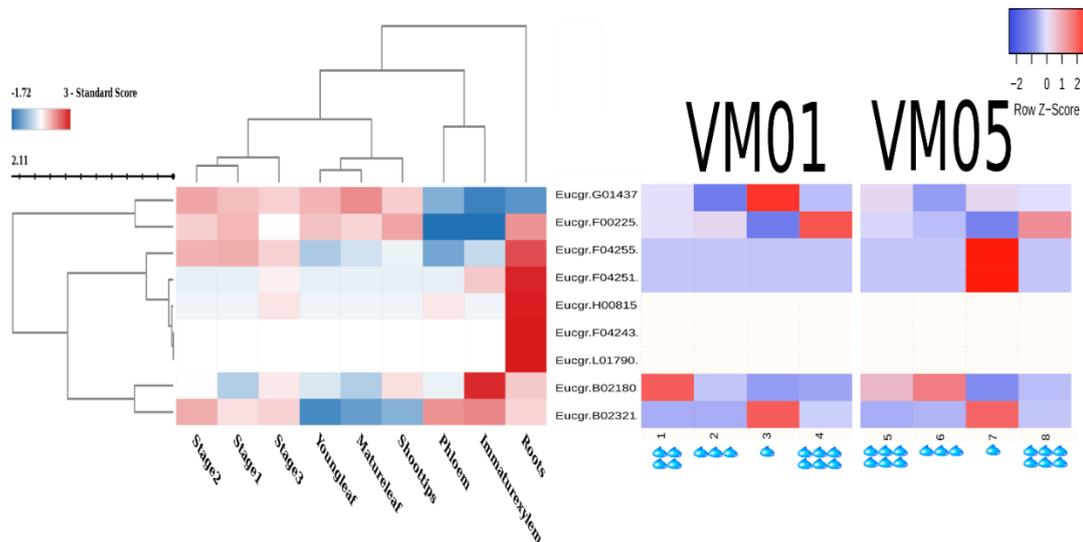
Figura 1.11 – Expressão relativa dos genes relacionados ao transporte de ABA.



Legenda: À direita, o *heatmap* apresenta a expressão dos genes em condições normais (não estressantes); à direita, apresenta nas condições impostas pelos tratamentos, em tecidos foliares dos clones VM01 e VM05. **1-4**: respectivamente CT, T3, T6 e RS do clone VM01; **5-8**: respectivamente CT, T3, T6 e RS do clone VM05. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação. As diferenças na expressão gênica são observadas ao se comparar os genes dentro de uma mesma linha.

A última etapa da regulação do ABA envolve genes relacionados aos processos de degradação/inativação do ABA. O perfil de expressão desses genes em diversos tecidos de eucalipto, em condições normais e estressantes, está apresentado na Figura 1.12.

Figura 1.12 – Expressão relativa dos genes relacionados à degradação de ABA.



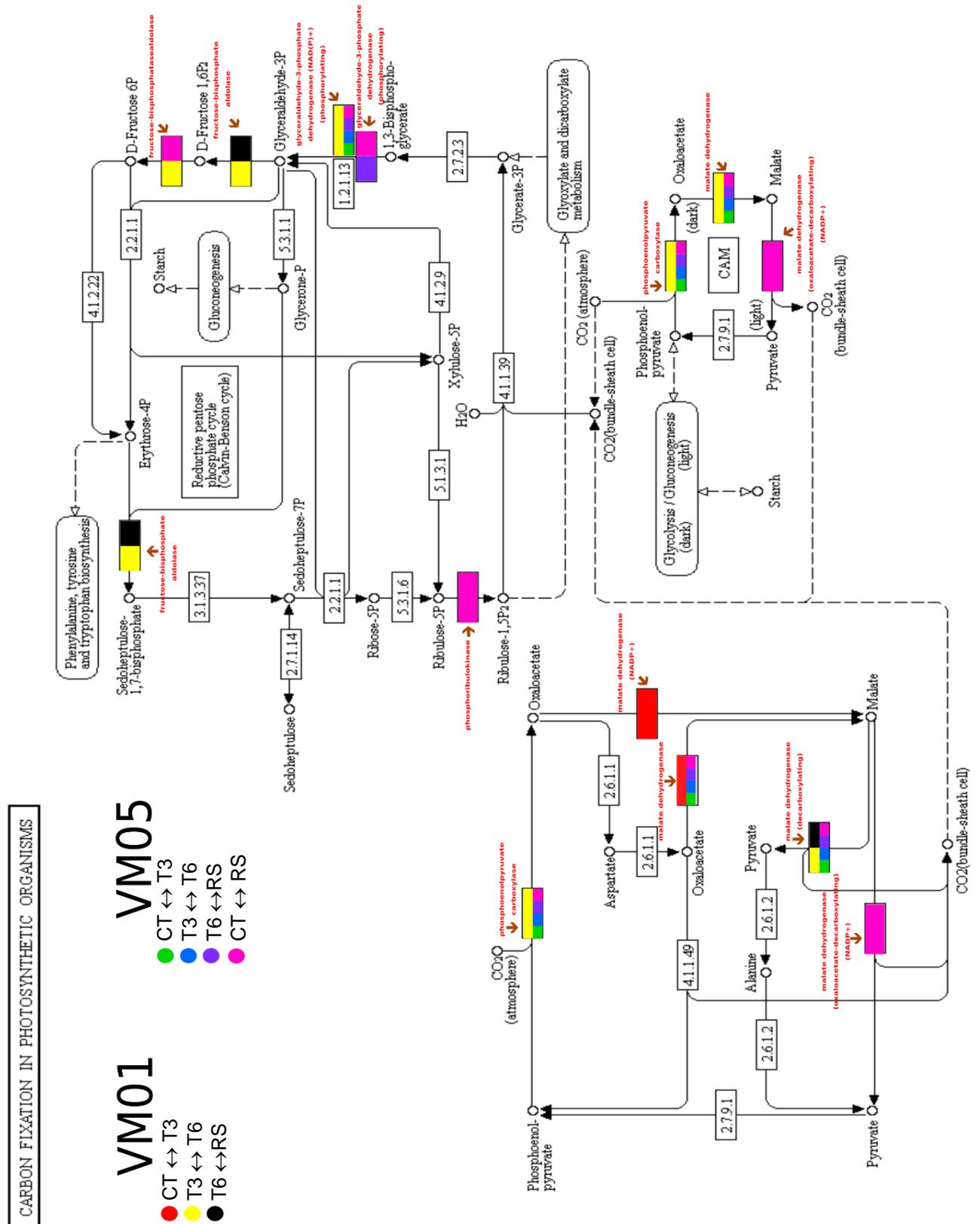
Legenda: À direita, o *heatmap* apresenta a expressão dos genes em condições normais (não estressantes); à direita, apresenta nas condições impostas pelos tratamentos, em tecidos foliares dos clones VM01 e VM05. **1-4:** respectivamente CT, T3, T6 e RS do clone VM01; **5-8:** respectivamente CT, T3, T6 e RS do clone VM05. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação. As diferenças na expressão gênica são observadas ao se comparar os genes dentro de uma mesma linha.

Apenas nove genes relacionados a esses processos foram identificados em eucalipto. Desses genes de degradação identificados, três não apresentaram expressão em tecidos foliares expostos ao déficit hídrico. Em condições normais, estes mesmos genes são expressos apenas em raízes. Os demais genes apresentaram expressão variada entre os tratamentos e os clones. Por exemplo, o primeiro gene identificado, *Eucgr.G01437*, é expresso em folhas em condições não estressantes, mas em resposta ao déficit hídrico, sua expressão foi reprimida nestes tecidos, sendo detectada apenas sob estresse mais severo (T6), no clone VM01. Em contrapartida, os genes *Eucgr.F04255* e *Eucgr.F04251* estão expressos nessas mesmas condições, mas apenas no clone VM05.

Rotas metabólicas da fotossíntese

A anotação do genoma no banco de dados KEGG possibilitou que os genes diferencialmente expressos fossem identificados e relacionados à algumas rotas metabólicas. Entre as rotas que mais apareceram nas comparações, duas relacionadas à fotossíntese, foram selecionadas para discussão: fixação de carbono (FIGURA 1.13) e metabolismo de amido e sacarose (FIGURA 1.14). As enzimas envolvidas nesses processos, que foram relacionadas com alterações nos processos transcricionais entre os tratamentos, foram identificadas nas rotas e realçadas por cores diferentes entre os tratamentos.

Figura 1.13 – Rota metabólica da fixação de carbono pela fotossíntese, destacando as enzimas alteradas entre os tratamentos, comparando os clones VM01 e VM05.



Legenda: Os retângulos coloridos representam as enzimas alteradas pela transcrição, de acordo com as comparações realizadas entre os tratamentos. CT = plantas irrigadas; T3 = 3 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

A rota de fixação de carbono pela fotossíntese nas condições impostas pelos tratamentos está representada na Figura 1.13. Uma visão geral desta rota permite perceber que muitas enzimas tiveram sua atividade afetada pelos diferentes tratamentos e que a maioria delas foram detectadas em plantas do clone VM05. Nas plantas do clone VM01, as maiores diferenças são detectadas do terceiro dia de déficit hídrico (T3) para o sexto (T6).

Na Figura 1.14, é apresentado o metabolismo de amido e sacarose, com as enzimas destacadas em colorido representando alterações nas suas atividades. É possível perceber que essas alterações foram detectadas em quase todas as conexões da rota, para ambos os clones, mas apenas na fase final do estresse e na fase de recuperação, após reestabelecimento da irrigação. Na primeira comparação avaliada (CT ↔ T3), plantas sempre irrigadas ↔ plantas sob três dias de déficit hídrico) apenas quatro enzimas apresentaram algum tipo de alteração, sendo três relacionadas ao clone VM01 e uma relacionada ao clone VM05.

DISCUSSÃO

Estresse e potencial hídrico

O estudo do transcriptoma dos clones de eucalipto VM01 e VM05 teve como objetivo identificar genes potencialmente relacionados à resposta ao déficit hídrico e entender, de maneira geral, como o transcriptoma desses clones contrastantes se comporta em condições estressantes. A sobrevivência está relacionada com a habilidade da planta em reconhecer os estímulos do ambiente, gerar respostas e transmiti-las pelas células via alterações moleculares e fisiológicas (KINOSHITA; SEKI, 2014; McKIERNAN et al., 2017). Para investigar isso, as plantas foram analisadas após dois tratamentos de déficit hídrico (T3 e T6) e um tratamento de recuperação (RS).

Uma das formas de mensurar esse déficit é através da avaliação do potencial hídrico das plantas, parâmetro que se torna cada vez mais negativo à medida que o estresse torna-se mais duradouro (WANG et al., 2018b). Nos tratamentos avaliados, observa-se que a primeira redução do potencial hídrico, em ambos os clones, ocorreu quando as plantas estavam há três dias sem água (T3) (GRÁFICO 1.1), sendo que nas plantas do clone VM01 essa queda foi um pouco mais acentuada. Esse padrão de diminuição do potencial hídrico se manteve até o último dia de estresse imposto (T6) e acarretou mudanças fenotípicas nas plantas, representadas pela murcha e amarelamento das folhas e curvatura dos ápices (FIGURA 1.4). Estas reduções no potencial hídrico são acompanhadas por declínios em outros processos fisiológicos, como condutância estomática e pressão de turgor (BARTLETT et al., 2016; CHOAT et al., 2018).

Tais processos geram respostas variadas, de acordo com a severidade do estresse e com o tempo que cada material demora para perceber os estímulos e ativar as respostas de defesa. Em condições de déficit hídrico moderado, a planta tende a priorizar a manutenção das relações hídricas; já em déficits mais agudos, a proteção do aparato fotossintético é favorecida, principalmente porque esse estresse vem acompanhado de aumento na temperatura interna da planta (REYNOLDS-HENNE et al., 2010).

As diferenças observadas entre os clones VM01 e VM05, principalmente nos perfis de expressão gênica, variaram pois as plantas apresentam estratégias e capacidades diferentes de manter seu metabolismo em condições adversas (HODECKER et al., 2018; HOLLAND et al., 2016). Essa variação tem base em mecanismos moleculares e genéticos (McDOWELL et al., 2008; ZARGAR et al., 2017).

Genes diferencialmente expressos e fatores de transcrição

Para verificar as mudanças no transcriptoma dos dois clones de eucalipto após sucessivos dias de déficit hídrico, foram analisadas oito bibliotecas de cDNA, que ofereceram as primeiras informações para compreensão das respostas das plantas às oscilações na disponibilidade de água. O conhecimento do transcriptoma das espécies permite identificar redes de genes que condicionam adaptações a ambientes diversos, além de destacar os tecidos nos quais um gene de função desconhecida é expresso (KUKURBA; MONTGOMERY, 2015; MIZOI; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012).

Uma das ferramentas disponíveis para esse estudo é o RNA-seq. O sequenciamento das amostras foliares de eucalipto gerou mais de 30 milhões de *reads* em cada biblioteca analisada. Dessas leituras, foram identificados centenas de genes diferencialmente expressos entre os clones VM01 e VM05, que demonstraram ser responsivos ao déficit hídrico (FIGURA 1.6). As análises também revelaram que o perfil de expressão desses genes variou nos diferentes dias de estresse e entre os dois clones. Esses genes têm potencial para serem usados em programas de melhoramento que visam a tolerância das plantas ao déficit hídrico.

Foram identificados também vários fatores de transcrição, relacionados com a ativação de múltiplas rotas de resposta de defesa das plantas (FIGURA 1.7). Os fatores de transcrição são proteínas envolvidas nas etapas iniciais de expressão e regulação gênica e na transdução de sinais e estão entre os principais mecanismos celulares que regulam a sobrevivência e/ou tolerância das plantas a estímulos ambientais (KANG et al., 2002; NEPOMUCENO et al., 2011; ZANDALINAS et al., 2018). O agrupamento dos fatores de transcrição identificados, de acordo

com suas famílias, permitiu atribuir a eles funções às quais estão relacionados (TABELA 1.4). Como as características de tolerância ao déficit hídrico envolvem a interação de vários genes para expressão de determinada característica, o uso de fatores de transcrição em trabalhos visando o aprimoramento das respostas vegetais ao déficit hídrico é fundamental, uma vez que estes fatores regulam a expressão de vários grupos de genes, além de participarem das etapas iniciais do processo de percepção e sinalização do estresse (KIM et al., 2018; LUO et al., 2019; NAKASHIMA et al., 2012; ZHANG et al., 2019).

Das famílias de fatores de transcrição identificadas, 19 foram comuns aos clones VM01 e VM05, sendo que a G2-like foi a que teve o maior número de fatores associados a ela nas plantas analisadas. Membros desta família atuam na regulação da formação de cloroplastos, entre as fases de transição e maturação (LIU et al., 2016). Estudos mais aprofundados sobre a relação desses fatores de transcrição com a regulação sob déficit hídrico apresentam apenas hipóteses vagas, sem dados biológicos que comprovem sua associação com este tipo de estresse.

As famílias MYB e bHLH também tiveram vários fatores de transcrição identificados nas plantas analisadas. Proteínas MYB estão relacionadas às respostas vegetais sob estresse prolongado, uma vez que são sintetizadas após o acúmulo de ABA nas folhas (LI et al., 2016; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Muitos genes relacionados aos fatores de transcrição dessa família são regulados positivamente pelo déficit hídrico, onde atuam regulando o fechamento estomático e melhorando a tolerância das plantas à perda de água (BALDONI; GENGA; COMINELLI, 2015; KATIYAR et al., 2012).

As proteínas bHLH atuam na ativação ou repressão da transcrição, variando o perfil de expressão de acordo com as propriedades de cada fator de transcrição (PETRIDIS et al., 2016). Estudos com *Populus davidiana* revelaram que os fatores desta família integram uma rede de sinalização metabólica em respostas ao déficit hídrico e ao frio, com atuação sinérgica com alguns fitormônios e com processos redox (MUN et al., 2017). Outros estudos já revelaram que essas respostas hormonais envolvem o ácido jasmônico e sua interação com o ABA na sinalização do estresse e na regulação da tolerância (MENG et al., 2018; WANI et al., 2016).

A combinação das regulações de vários fatores de transcrição diferentes gera uma rede gênica que pode responder a estímulos específicos, como o déficit hídrico, com alguns genes sendo ativados e alguns reprimidos (MAGALHÃES et al., 2016). Para compreender melhor quais destes fatores tiveram mais participação nas condições impostas neste estudo, os 10 fatores de transcrição que apresentaram mais conexões entre os tratamentos, foram relacionados em uma nova rede de correlação (FIGURA 1.8). Em *E. grandis*, após a indução do déficit hídrico, foram identificadas 20 famílias de fatores de transcrição, envolvidas na regulação de

respostas à privação de água, entre elas a MYB e WRKY (DASGUPTA; DHARANISHANTHI, 2017), famílias que também foram identificadas nas bibliotecas analisadas neste trabalho.

A identificação dos 10 fatores de transcrição com mais conexões (FIGURA 1.8) revelou que seis famílias estavam associadas a estes fatores, sendo que a bHLH tinha três desses fatores associados a ela. Os fatores de transcrição com mais conexões indicam que eles estão relacionados com um maior número de condições/tratamentos, ou seja, participam em diversas fases do estresse.

As próximas famílias com mais fatores de transcrição associados a elas foram a G2-like e a MYB_related, cada uma com dois fatores identificados. Estas duas famílias são pouco caracterizadas quanto às suas respostas ao déficit hídrico, principalmente em espécies lenhosas. Plantas transgênicas de arroz, super expressando o fator de transcrição OsMYBR1, alteraram sua sensibilidade ao ABA em condições de déficit hídrico, o que sugere que membros da família MYB_related estão envolvidos nas vias dependentes de ABA (YIN et al., 2016).

As outras famílias identificadas, ARF, MIKC-MADS e Dof, tinham apenas um fator de transcrição, entre os 10 identificados na Figura 1.8, associado a elas. ARF (Fator de resposta à auxina) é uma família de fatores de transcrição responsivos à auxina, envolvidos nas respostas de crescimento e nas cascatas de sinalização à estresses abióticos (HUANG et al., 2016; ZHOU et al., 2018). A família MIKC-MADS está associada aos processos de desenvolvimento e especificação dos órgãos florais; entretanto, estudos recentes revelaram que alguns membros respondem à estresses abióticos, atuando na melhoria da tolerância de algumas culturas (SAHA et al., 2015; SCHILLING et al., 2019). Já a família Dof têm muitos fatores bem caracterizados, com respostas à vários processos vegetais. Em resposta ao déficit hídrico eles atuam na assimilação de carbono fotossintético, ativação da expressão gênica e regulação estomática (CORRALES et al., 2017; WANG et al., 2017a).

Agrupamento de genes associadas ao déficit hídrico

Além da identificação dos fatores de transcrição e de suas famílias, foi avaliada também a distribuição geral dos genes nas bibliotecas, com base em 24 grupos que reuniram estes genes de acordo com suas funções, determinadas pelos domínios conservados (FIGURA 1.9). A expressão desses genes pode variar em diferentes tensões, tecidos e estágios de desenvolvimento (XIONG; ZHU, 2003; WANG et al., 2009).

Ao comparar os clones VM01 e VM05 percebe-se que o padrão de distribuição da expressão dos grupos gênicos não variou muito; entretanto, entre os tratamentos, essa variação é perceptível. A expressão dos genes organizados nos grupos ABA, antioxidantes, canal de potássio, fotossíntese e transporte de íons variou entre os dias de déficit hídrico nos dois clones, de modo perceptível. Além destes genes, plantas VM01 variaram também a expressão de genes associados à transdução de sinais; já plantas VM05 variaram a expressão no grupo de ATP *binding*.

Entre os vários processos afetados pela escassez de água, a fotossíntese é um dos que sofre mais modulações, fato que reflete diretamente na produção e no rendimento das culturas (ZARGAR et al., 2017). As alterações na expressão dos genes desse grupo, para os dois clones, foi mais perceptível de três (T3) para seis dias de déficit hídrico (T6). Este estresse afeta tanto as reações fotoquímicas quanto a eficiência de assimilação das reações seguintes, reduzindo o conteúdo dos produtos fotossintéticos (FANG; XIONG, 2015).

Embora os genes tenham sido agrupados em processos distintos, a maioria deles atua em cooperação, influenciando as respostas uns dos outros (DASGUPTA; DHARANISHANTHI, 2017). Entre os grupos de genes com forte correlação, a transdução de sinais e o ABA se destacam, pois ambos participam da sinalização do estresse. De modo geral, o ABA atua desde os primeiros sinais do déficit hídrico, por estar envolvido nos processos de transdução; por isso, pequenas alterações na sua expressão podem refletir em resultados do início ao fim do processo de resposta (LI et al., 2016; WOO et al., 2011; ZHU, 2002).

Para a sinalização do ABA induzida pelo déficit hídrico, várias proteínas quinases e fosfatases são ativadas e participam dos eventos de transdução de sinais (DASZKOWSKA-GOLEC; SZAREJKO, 2013). Nestes casos, o ABA pode induzir a expressão de genes envolvidos com a fosforilação ou atuar apenas na promoção da atividade dessas proteínas. As fosfatases podem ainda interagir com fatores de transcrição que se ligam à elementos responsivos ao ABA (ABRE) e controlar a expressão de genes responsivos ao ABA (LIM et al., 2015; LIU et al., 2018; WANG et al., 2016).

As modulações observadas na expressão dos genes relacionados ao ABA (FIGURA 1.9), referem-se aos genes envolvidos na biossíntese e degradação/inativação desse fitormônio, isso porque, em resposta ao déficit hídrico, estes dois processos ocorrem em paralelo, para garantir que os níveis de ABA mantenham-se dentro de um intervalo admissível (LONG et al., 2019). Além de induzir a síntese de ABA para sinalização, fechamento estomático e indução de compostos osmoprotetores, a escassez de água pode regular positivamente vários genes que codificam enzimas de degradação, que serão utilizadas pelas células quando os níveis de água

voltarem ao normal. Esses produtos ficam armazenados no vacúolo ou apoplasto e ajudam a garantir a homeostase celular (KRANNICH et al., 2015; WANG et al., 2016; ZOU et al., 2010).

Outros grupos com forte correlação são aqueles que agrupam genes envolvidos no transporte de íons e no metabolismo antioxidante. Em todas as bibliotecas avaliadas os genes destes grupos apresentaram expressão elevada e discrepante. Isso porque condições estressantes causam o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, alterando o estado redox das células (HE; HE; DING, 2018; LUO et al., 2019). Os danos inerentes a esse acúmulo são neutralizados pelas enzimas antioxidantes, que também podem ter sua atividade prejudicada em tensões muito severas (THUMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012; ZANDALINAS et al., 2019). Essa atividade antioxidante é estimulada pelas perturbações na fotossíntese, em função do excesso de energia acumulado e do desequilíbrio entre disponibilidade e consumo de elétrons ao longo da cadeia transportadora (LAXA et al., 2019; WANG et al., 2018b), motivo pelo qual todos os genes envolvidos nessas respostas variaram sua expressão ao longo do estresse.

Genes reguladores do ABA

Após avaliar a distribuição geral dos genes e o perfil da sua expressão ao longo dos tratamentos de déficit hídrico, foi feita uma análise mais detalhada e comparativa dos genes relacionados aos processos de biossíntese, transporte e degradação de ABA. O objetivo foi entender o funcionamento destes genes em resposta ao déficit hídrico. A distribuição da expressão relativa foi feita em condições não estressantes/normais, em nove tecidos diferentes, e em condições estressantes, em tecidos foliares submetidos à quatro tratamentos diferentes.

Plantas de sorgo, consideradas modelo para o estudo de respostas ao déficit hídrico devido à sua alta capacidade de tolerar a seca, tiveram seu transcriptoma analisado após passarem por estresse induzido por PEG. O estudo revelou mais de 28 mil genes expressos em resposta ao déficit hídrico e uma forte interação destes genes com vias metabólicas, principalmente o ABA (DUGAS et al, 2011). Todas essas vias são controladas pela relação entre biossíntese e catabolismo do ABA (CUTLER et al., 2010; FINKELSTEIN, 2013).

Em condições normais de desenvolvimento, a biossíntese de ABA ocorre de maneira mais acentuadas nas raízes; em resposta ao déficit hídrico, sua biossíntese é estimulada nas folhas, onde o aumento da sua concentração induz o fechamento estomático (NEPOMUCENO et al, 2011; SHARP, 2002). A translocação do ABA das raízes para as folhas é feita na forma aniônica; uma vez translocado, ele migra para o interior das células do estômato e induz o

fechamento das células-guarda, diminuindo assim a condutância estomática e a taxa fotossintética (DEJONGHE; OKAMOTO; CUTLER, 2018). Sob baixa disponibilidade de água, as concentrações de ABA também aumentam, pois a forma conjugada deste composto passa a ser clivada e liberada, onde é transportada para as células-guarda (KRANNICH et al., 2015).

Variações nesse padrão de distribuição do ABA foram observados, indiretamente, com as análises de expressão relativa representadas nas Figuras 1.10, 1.11 e 1.12. Foram encontrados 31 genes envolvidos com a biossíntese de ABA e a maioria deles alterou a expressão sob déficit hídrico, em tecidos foliares. Em condições normais, esses mesmos genes são mais expressos nas raízes, mesmo comportamento observado nos genes de transporte identificados. A diferença entre os grupos de genes de biossíntese e transporte pode ser observada ao comparar plantas sempre irrigadas (CT) com plantas que ficaram três dias sob déficit hídrico (T3). Nestas condições houve um aumento da expressão relativa dos genes de transporte, indicando que esse estresse foi suficiente para mobilizar o ABA que estava sendo produzido para as folhas. Esse aumento da expressão continuou até os seis dias de déficit hídrico (T6), mostrando que alguns desses genes são regulados positivamente pelo estresse, nos clones VM01 e VM05.

Em relação à degradação do ABA, apenas nove genes foram identificados, sendo que três deles não foram expressos nas condições de déficit hídrico impostas. Alguns genes foram expressos apenas no déficit hídrico mais severo (T6), sendo que não foram os mesmos em VM01 e VM05. Esses genes podem estar envolvidos em processos de hidroxilação ou conjugação, modos como o ABA pode ser catabolizado (MATILLA; CARRILO-BARRAL; RODRÍGUEZ-GACIO, 2015) e podem indicar estratégias de sobrevivência/tolerância ao déficit hídrico entre os clones avaliados. Estudos da caracterização desses genes ainda são escassos e requerem a interação de vários fatores, para ser possível afirmar que suas respostas são em função do estresse. A informação mais precisa que se têm até o momento é que a indução desses genes catabólicos pode ser responsiva à desidratação e ela ocorre para manter os níveis adequados de ABA dentro das células (LONG et al., 2019).

Rotas metabólicas

Além do ABA, foi feita também uma análise geral da atividade das enzimas envolvidas em duas rotas metabólicas da fotossíntese: fixação de carbono (FIGURA 1.13) e metabolismo de amido e sacarose (FIGURA 1.14). A obtenção dessas informações ajuda a prever os genes reguladores em vias metabólicas específicas, fornecendo a base para a engenharia genética

modificar as características associadas (CHANG et al, 2018). Além disso, torna possível a análise das interações transcricionais com vários tipos de estresse, como o déficit hídrico e a seleção de clones e espécies tolerantes a esses fatores (MEYERS et al., 2004; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Existem vários tipos de respostas das plantas ao déficit hídrico, que concorrem para a manutenção do seu status hídrico e dos processos fisiológicos e bioquímicos vitais (GRANDA; CAMARERO, 2017). Sob déficit hídrico, a dinâmica de carbono é influenciada pelos processos de assimilação, mobilização dos compostos armazenados e demanda nos tecidos (HARTMANN; TRUMBORE, 2016; PIPER; FAJARDO, 2016). Nestas condições, o processo de fixação de carbono é afetado negativamente pelo fechamento estomático e vários danos ocorrem no aparelho fotossintético (WANG et al., 2018b).

A observação da rota de fixação de carbono (FIGURA 1.13) indicou que as plantas VM01 sofreram alteração enzimática nas enzimas de síntese de sacarose (sacarose fosfato sintase e sacarose sintase), principalmente entre três (T3) e seis dias de déficit hídrico (T6). Nas folhas, as hexoses podem ser convertidas em sacarose pela ação dessas duas enzimas, sendo que ambas afetam a proporção de sacarose que pode ser convertida em outros carboidratos, como o amido (XU et al., 2015). As variações nessa distribuição afetam a translocação de água e solutos, as reservas de energia para crescimento e à amplificação de sinais de defesa (BECHTOLD; FIELD, 2018; BERENGUER et al., 2018). Estudos com plantas transgênicas de tabaco, revelaram que a super expressão de uma enzima chave na biossíntese de sacarose melhorou a tolerância das plantas ao déficit hídrico (HE et al., 2015).

Em contrapartida, nas plantas VM05, as maiores alterações foram observadas nas enzimas envolvidas com a trealose. Em condições de déficit hídrico, a biossíntese deste composto é induzida e ele passa a atuar como reserva de açúcar, na manutenção da integridade da membrana celular e na prevenção da degradação de proteínas (GE et al., 2008; MENG et al., 2018).

Em comum aos dois clones, muitas glucosidases atuando no metabolismo de glicose e frutose, sofreram alteração em condições de déficit hídrico. Estudos que avaliaram a atividade dessas enzimas já revelaram que elas têm atividade modulada pela severidade e duração do estresse, atuando na liberação controlada de carbono em condições adversas (REN et al., 2019; WANG et al., 2017b). No fim do estresse e no reestabelecimento da irrigação, destacaram-se as enzimas α e β -amilase, responsáveis pela clivagem do amido armazenado que irá sustentar o metabolismo da planta em condições de baixa assimilação de carbono (THALMANN; SANTELIA, 2017; ZANELLA et al., 2016).

Assim, nas condições impostas às plantas, observa-se que as enzimas envolvidas na rota de fixação de carbono foram mais afetadas, em decorrência das alterações transcricionais, no clone VM05, entre todos os tratamentos. No clone VM01, essa variação foi observada apenas no fim do déficit hídrico, entre as plantas que estavam à três (T3) e seis dias sem água (T6). Essa rota influencia diretamente o metabolismo de carboidratos, representado pela Figura 1.14. Neste caso, quatro enzimas destacaram-se nas plantas VM01 em início de estresse (plantas irrigadas (CT) x plantas a três dias sem água (T3)), enquanto apenas uma destacou-se no clone VM05. As principais alterações enzimáticas foram observadas apenas na fase final do estresse. Em plantas do clone VM05, observa-se que muitas enzimas foram influenciadas pelas modificações transcricionais entre CT e RS (plantas sempre irrigadas x plantas reidratadas após seis dias de déficit hídrico), em todas as etapas exemplificadas na rota. Em plantas do clone VM01, diferenças entre esses tratamentos não foram detectadas.

A sobrevivência das árvores em ambientes com baixa disponibilidade de água pode depender também da acessibilidade e transporte dos compostos de carbono reservados sob déficit hídrico (HAGEDORN et al., 2016; VILLAR et al., 2011). Como organismos perenes de vida longa, as árvores mantêm ativamente um *pool* de limite mínimo de carbono armazenado, cuja função é manter o turgor celular e a integridade dos tecidos vasculares, frente às condições ambientais imprevisíveis e flutuantes (GRANDA; CAMARERO, 2017; PIPER; FAJARDO; HOCH, 2017). Os carboidratos, gerados pela fotossíntese, são a fonte de energia e substrato para a manutenção da fitomassa (THUMA; SHARMA; SOUTHERTON, 2012; VILLAR et al., 2011). Entre eles, a sacarose é um dos compostos fundamentais para esse crescimento, uma vez que está ligada à vários processos de biossíntese, transdução de sinais, regulação da osmorregulação e partição da biomassa (XU et al., 2015).

Decifrar a base molecular das respostas à essas características e o mecanismo de desenvolvimento da tolerância é um processo complexo, mas que pode facilitar a obtenção de cultivares com maior tolerância ao déficit hídrico ou demais estresses abióticos (HUSSAIN et al., 2018; WANG et al., 2009; ZANDALINAS et al., 2018). Para isso esses mecanismos devem ser investigados, inicialmente, por análises mais amplas, que envolvam várias técnicas, tais como genética molecular, genômica funcional, transcriptômica, proteômica, metabolômica e técnicas avançadas de fenotipagem (ABDEEN; SCHNELL; MIKI, 2010; DASZKOWSKA-GOLEC; SZAREJKO, 2013; FANG; XIONG, 2015; GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008; RAMAKRISHNA; GILL, 2018; VALDÉS et al., 2013).

Os dados gerados pelas análises de RNA-seq dos clones contrastantes VM01 e VM05, revelaram um grande número de genes e vias que podem ser afetados pelo déficit hídrico. Essas

respostas são os passos iniciais para entender como o eucalipto responde ao déficit hídrico em nível transcricional, principalmente por trazer análises que exemplifiquem as diferenças em clones com materiais genéticos diferentes. A escolha correta do clone/híbrido a ser plantado é fundamental para a sobrevivência do eucalipto em condições de baixa disponibilidade hídrica (GONÇALVES et al., 2013; SILVA et al., 2016).

Estudos futuros podem continuar investigando o mecanismo molecular da tolerância ao déficit hídrico nos clones VM01 e VM05, ou em demais espécies de eucalipto, através de análises transcriptômicas das associações de famílias gênicas e suas características funcionais.

CONCLUSÃO

As análises de RNA-seq identificaram numerosos genes diferencialmente expressos em plantas dos clones VM01 e VM05. Além dos genes já caracterizados, também foram detectados genes desconhecidos com expressão diferencial. A análise funcional desses genes pode fornecer *insights* sobre o controle genético da tolerância ao déficit hídrico em eucalipto.

As redes de correlação geradas com os fatores de transcrição permitiram destacar seis famílias com potencial para fornecer respostas sobre o mecanismo de tolerância das plantas ao déficit hídrico.

Dos vários processos afetados pela escassez de água, a dinâmica do ABA e as rotas do carbono fotossintético demonstraram ser influenciados pelo déficit hídrico em eucalipto, apresentando respostas diferentes em materiais genéticos contrastantes.

A associação dos dados transcricionais obtidos com o conhecimento do metabolismo de plantas pode gerar dados mais consistentes sobre o processo de tolerância ao déficit hídrico. O entendimento deste processo nos clones avaliados pode auxiliar a seleção de genótipos de interesse em programas de melhoramento.

O conhecimento da base molecular de respostas do eucalipto ao déficit hídrico ainda não está claro, uma vez que essas espécies apresentam ciclo de vida longo e passam por mudanças na disponibilidade de água várias vezes. Entretanto, as análises do perfil de expressão e identificação de genes e fatores de transcrição relacionados com processos de resposta ao déficit hídrico em dois híbridos contrastantes de eucalipto, representam um avanço nas pesquisas deste gênero.

REFERÊNCIAS

- ABDEEN, A.; SCHNELL, J.; MIKI, B. Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor *ABF3*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 69, p. 1-21, 2010.
- BALDONI, E.; GENGA, A.; COMINELLI, E. Plant MYB Transcription Factors: Their Role in Drought Response Mechanisms. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15811-15851, 2015.
- BARTLETT, M. K. et al. The correlations and sequence of plant stomatal, hydraulic, and wilting responses to drought. **PNAS**, v. 113, n. 46, p. 13098-12103, 2016.
- BASU, S. et al. Plant adaptation to drought stress. **F1000 Research**, v. 5, n. 1554, p. 1-10, 2016.
- BECHTOLD, U.; FIELD, B. Molecular mechanisms controlling plant growth during abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 11, p. 2753-2758, 2018.
- BERENGUER, H. D. P. et al. Differential physiological performance of two *Eucalyptus* species and one hybrid under different imposed water availability scenarios. **Trees**, n. 32, p. 415-427, 2018.
- CHANG, S. et al. Genetic engineering of trees: progress and new horizons. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 54, p. 341-376, 2018.
- CHENG, L. et al. Expressional characterization of galacturonosyltransferase-like gene family in *Eucalyptus grandis* implies a role in abiotic stress responses. **Tree Genetics & Genomes**, v. 14, n. 81, p. 1-11, 2018.
- CHEN, Y.; LUN, A. T. L.; SMYTH, G. K. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. **F1000Research**, v. 5, n. 1438, p. 1-48, 2016.
- CHIN, C.-H. et al. *cytoHubba*: identifying hub objects and subnetworks from complex interactome. **BMC Systems Biology**, v. 8, n. 11, p. 1-7, 2014.
- CHOAT, B. et al. Triggers of tree mortality under drought. **Nature**, v. 558, p. 531-540, 2018.
- CONESA, A.; GOTZ, S. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, n. 619832, p. 1-12, 2008.
- CORRALES, A.-R. et al. Multifaceted role of cycling DOF factor 3 (CDF3) in the regulation of flowering time and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. **Plant, Cell and Environment**, v. 40, n. 5, p. 748-764, 2017.
- CUTLER, S. R. et al. Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 651-679, 2010.
- DASGUPTA, M. G.; DHARANISHANTHI, V. Identification of PEG-induced water stress responsive transcripts using co-expression network in *Eucalyptus grandis*. **Gene**, v. 627, p. 393-407, 2017.
- DASZKOWSKA-GOLEC, A.; SZAREJKO, I. The Molecular Basis of ABA-Mediated Plant Response to Drought. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. (Eds.). **Abiotic Stress – Plant**

- Responses and Applications in Agriculture.** Croatia: Intechopen, 2013, p. 103-133.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/45842>>. Acesso em: 14 jul. 2019.
- DEJONGHE, W.; OKAMOTO, M.; CUTLER, S. R. Small Molecule Probes of ABA Biosynthesis and Signaling. **Plant and Cell Physiology**, v.59, n. 8, p. 1-10, 2018.
- DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15-21, 2013.
- DUGAS, D. V. et al. Functional annotation of the transcriptome of *Sorghum bicolor* in response to osmotic stress and abscisic acid. **BMC Genomics**, v. 12, n. 514, p. 1-21, 2011.
- FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 673-689, 2015.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2016. **Global forest resources assessment 2015: How are the world's forests changing?** 2 ed. 54 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4793e.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2019.
- FERNÁNDEZ, F.; TRONCOSO, V.; VALENZUELA, S. Transcriptome Profile in Response to Frost Tolerance in *Eucalyptus globulus*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, p. 1472-1485, 2015.
- FINKELSTEIN, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. **The Arabidopsis Book**, v. 11, p.1-52, 2013.
- FITTER, D. W. et al. *GLK* gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. **The Plant Journal**, v. 31, n. 6, p. 713-727, 2002.
- GE, L.-R. et al. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPPI* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. **Planta**, v. 228, p. 191-201, 2008.
- GONÇALVES, J. L. de M. et al. Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 6-27, 2013.
- GONG, L. et al. Transcriptome Profiling of the Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plant under Drought Stress and Water-Stimulus Conditions. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1-20, 2015.
- GRANDA, E.; CAMARERO, J. J. Drought reduces growth and stimulates sugar accumulation: new evidence of environmentally driven non-structural carbohydrate use. **Tree Physiology**, n. 37, p. 997-1000, 2017.
- GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, v. 179, p. 911-929, 2008.
- GUILFOYLE, T. J.; HAGEN, G. Auxin response factors. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 453-460, 2007.
- HAGEDORN, F. et al. Recovery of trees from drought depends on belowground sink control. **Nature Plants**, v. 2, n. 16111, p. 1-5, 2016.

- HARTMANN, H.; TRUMBORE, S. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. **New Phytologist**, v. 211, p. 386-403, 2016.
- HE, M.; HE, C.-Q.; DING, N.-Z. Abiotic Stress: General. Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1771, p. 1-18, 2018.
- HE, X. et al. A sucrose: fructan-6-fructosyltransferase (*6-STF*) gene from *Psathyrostachys huashanica* confers abiotic stress tolerance in tobacco. **Gene**, v. 570, p. 239-247, 2015.
- HODECKER, B. E. R. et al. Water availability preceding long-term drought defines the tolerance of *Eucalyptus* to water restriction. **New Forests**, v. 49, p. 173-195, 2018.
- HOLLAND, V. et al. Drought- and frost-induced accumulation of soluble carbohydrates during accelerated senescence in *Quercus pubescens*. **Trees**, v. 30, p. 215-226, 2016.
- HUANG, X. et al. Identification and expression of Aux/IAA, ARF, and LBD family transcription factors in *Boehmeria nivea*. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 2, p. 244-250, 2016.
- HUSSAIN, H. A. et al. Chilling and Drought Stresses in Crop Plants: Implications, Cross Talk, and Potential Management Opportunities. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 393, p. 1-21, 2018.
- IBÁ (Indústria Brasileira de Árvores), 2019. **Cenários IBÁ: estatísticas da Indústria Brasileira de Árvores**. 7 p. Disponível em: < <https://iba.org/datafiles/e-mail-marketing/cenarios/cena-rios-57-1otrim-2019-iba.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2019.
- KANG, J.-Y. et al. *Arabidopsis* Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. **The Plant Cell**, v. 14, p. 343-357, 2002.
- KATIYAR, A. et al. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 544, p. 1-19, 2012.
- KIM, H. J. et al. Confirmation of Drought Tolerance of Ectopically Expressed *AtABF3* Gene in Soybean. **Molecules and Cells**, v. 41, n. 5, p. 413-422, 2018.
- KINOSHITA, T.; SEKI, M. Epigenetic Memory for Stress Response and Adaptation in Plants. **Plant Cell Physiology**, v. 55, n. 11, p. 1859-1863, 2014.
- KIRIK, V.; BAUMLEIN, H. A novel leaf-specific myb-related protein with a single binding repeat. **Gene**, v. 183, p. 109-113, 1996.
- KRANNICH, C. T. et al. Network Candidate Genes in Breeding for Drought Tolerant Crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 16378-16400, 2015.
- KUKURBA, K. R.; MONTGOMERY, S. B. RNA Sequencing and Analysis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 11, p. 951-969, 2015.
- LAXA, M. et al. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. **Antioxidants**, v. 8, n. 64, p. 1-31, 2019.
- LJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; VICENTE-CARBAJOSA, J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* Dof gene families. **BMC Evolutionary Biology**, v. 3, p. 1-11, 2003.

- LIM, C. W. et al. Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 15251-15270, 2015.
- LIM, J. H.; LEE, S. Y.; KIM, J. H. TRAPR: R Package for Statistical Analysis and Visualization of RNA-Seq Data. **Genomics and Informatics**, v. 15, n. 1, p. 51-53, 2017.
- LI, S. et al. Effects of drought and salt-stresses on gene expression in *Caragana korshinskii* seedlings revealed by RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 17, n. 200, p. 1-19, 2016.
- LIU, F. et al. Molecular Evolution and Genetic Variation of *G2-Like* Transcription Factor Genes in Maize. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1-20, 2016.
- LIU, S. et al. Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 3, p. 624-637, 2018.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-327, 1981.
- LONG, H. et al. An abscisic acid (ABA) homeostasis regulated by its production, catabolism and transport in peanut leaves in response to drought stress Short title: ABA homeostasis in peanut leaves in response to drought stress. **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, 2019.
- LUO, D. et al. Full-length transcript sequencing and comparative transcriptomic analysis to evaluate the contribution of osmotic and ionic stress components towards salinity tolerance in the roots of cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.). **BMC Plant Biology**, v. 19, p. 1-32, 2019.
- MAGALHÃES, A. P. et al. RNA-Seq and Gene Network Analysis Uncover Activation of an ABA-Dependent Signalosome During the Cork Oak Root Response to Drought. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1195, p. 1-17, 2016.
- MATILLA, A. J.; CARRILO-BARRAL, N.; RODRÍGUEZ-GACIO, M. del C. An Update on the Role of NCED and CYP707A ABA Metabolism Genes in Seed Dormancy Induction and the Response to After-Ripening and Nitrate. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 274-293, 2015.
- McDOWELL, N. et al. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? **New Phytologist**, v. 178, p. 719-739, 2008.
- McKIERNAN, A. R. et al. A water availability gradient reveals the deficit level required to affect traits in potted juvenile *Eucalyptus globulus*. **Annals of Botany**, v. 119, p. 1043-1052, 2017.
- MENG, H.-L. et al. Unigene-based RNA-seq provides insights on drought stress responses in *Marsdenia tenacissima*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1-20, 2018.
- MEYERS, B. C. et al. Methods for Transcriptional Profiling in Plants. Be Fruitful and Replicate. **Plant Physiology**, v. 135, p. 637-652, 2004.

- MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 86-96, 2012.
- MUN, B.-G. et al. Analysis of transcription factors among differentially expressed genes induced by drought stress in *Populus davidiana*. **3 Biotech**, v. 7, n. 209, p. 1-12, 2017.
- MYBURG, A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-374, 2014.
- NAKASHIMA, K. et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 97-103, 2012.
- NAM, J. et al. Antiquity and evolution of the MADS-box gene family controlling flower development in plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 9, p. 1435-1447, 2003.
- NEPOMUCENO, A. L. et al. Plantas geneticamente modificadas para tolerância a estresses abióticos. In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G. (Aut). **Plantas Geneticamente Modificadas: Desafios e Oportunidades para Regiões Tropicais**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011, p. 119-138.
- OLLAS, C. de; DODD, I. C. Physiological impacts of ABA-JA interactions under water-limitation. **Plant Molecular Biology**, v. 91, p. 641-650, 2016.
- PARENICOVÁ, L. et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. **The Plant Cell**, v. 15, n. 7, p. 1538-1551, 2003.
- PETRIDIS, A. et al. *Arabidopsis thaliana* G2-LIKE FLAVONOID REGULATOR and BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION1 are low-temperature regulators of flavonoid accumulation. **New Phytologist**, v. 211, p. 912-925, 2016.
- PIPER, F. I.; FAJARDO, A. Carbon dynamics of *Acer pseudoplatanus* seedlings under drought and complete darkness. **Tree Physiology**, v. 36, p. 1400-1408, 2016.
- PIPER, F. I.; FAJARDO, A.; HOCH, G. Single-provenance mature conifers show high non-structural carbohydrate storage and reduced growth in drier location. **Tree Physiology**, v. 37, p. 1001-1010, 2017.
- RAMAKRISHNA, A.; GILL, S. S. (Eds) **Metabolic Adaptations in Plants During Abiotic Stress**. Boca Raton: CRC Press, 1 ed., 2018. 442 p.
- REN, R. et al. Specific roles of Os4BGlu10, Os6BGlu24, and Os9BGlu33 in seed germination, root elongation, and drought tolerance in rice. **Planta**, v. 249, n. 6, p. 1851-1861, 2019.
- REYNOLDS-HENNE et al. Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 37-43, 2010.
- RODRIGUES, F. A. et al. Daytime soybean transcriptome fluctuations during water deficit stress. **BMC Genomics**, v. 16, n. 505, p. 1-19, 2015.

- SAHA, G. et al. Genome-wide identification and characterization of MADS-box family genes related to organ development and stress resistance in *Brassica rapa*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 178, p. 1-21, 2015.
- SCANAVACA JÚNIOR, L.; GARCIA, J. N. Potencial de melhoramento genético em *Eucalyptus urophylla* procedente da Ilha das Flores. **Scientia Forestalis**, n. 63, p. 23-32, 2003.
- SCHILLING, S. et al. Genome-wide analysis of MIKC-type MADS-box genes in wheat: pervasive duplications may have facilitated adaptation to different environmental conditions. **Biorxiv**, 2019.
- SHANNON, P. et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, p. 2498-2504, 2003.
- SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 211-222, 2002.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 2210-227, 2007.
- SILVA, I. M. de A. et al. Determination of parameters for selection of Eucalyptus clones tolerant to drought. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 40, p. 3940-3949, 2016.
- SIMURA, J. et al. Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. **Plant Physiology**, v. 177, p. 476-489, 2018.
- SPOKEVICIUS, A. V. et al. Medium term water deficit elicits distinct transcriptome responses in Eucalyptus species of contrasting environmental origin. **BMC Genomics**, v. 18, n. 284, p. 1-17, 2017.
- TARAZONA, S. et al. Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 21, p. 2-15, 2015.
- THALMANN, M.; SANTELIA, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, v. 214, p. 943-951, 2017.
- THUMMA, B. R.; SHARMA, N.; SOUTHERTON, S. G. Transcriptome sequence of *Eucalyptus camaldulensis* seedlings subjected to water stress reveals functional single nucleotide polymorphisms and genes under selection. **BMC Genomics**, v. 13, n. 364, p. 1-21, 2012.
- TOLEDO-ORTIZ, G.; HUG, E.; QUAIL, P. H. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. **The Plant Cell**, v. 15, p. 1749-1770, 2003.
- UMEZAWA, T. et al. Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 11, p. 1821-1839, 2010.

- VALDÉS, A. E. et al. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 79, p. 263-276, 2013.
- VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P. P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, v. 16, n. 86, p. 1-10, 2016. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 86, p. 1-21, 2016.
- VILLAR, E. et al. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **BMC Genomics**, v. 12, n. 538, p. 1-18, 2011.
- VINING, K. J. et al. The floral transcriptome of *Eucalyptus grandis*. *New Phytologist*, v. 206, p. 1406-1422, 2015.
- VINSON, C. C. et al. Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1-28, 2018.
- XIONG, L.; ZHU, J.-K. Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 133, p. 29-36, 2003.
- XU, W. et al. Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 9, p. 1-11, 2015.
- WAGNER, G. P.; KIN, K.; LYNCH, V. J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. **Theory in Biosciences**, Springer, v. 131, n. 4, p. 281-285, 2012.
- WANG, P. et al. Exploring transcription factors reveals crucial members and regulatory networks involved in different abiotic stresses in *Brassica napus* L. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 202, 2018a.
- WANG, H. et al. Characterization of Dof Transcription Factors and Their Responses to Osmotic Stress in Poplar (*Populus trichocarpa*). **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1-19, 2017b.
- WANG, X. et al. Organ-specific proteomics of soybean seedlings under flooding and drought stresses. **Journal of Proteomics**, v. 162, p. 62-72, 2017a.
- WANG, Z. et al. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. **Biology Open**, v. 7, p. 1-9, 2018b.
- WANG, Z. et al. Overexpressing *Arabidopsis ABF3* increases tolerance to multiple abiotic stresses and reduces leaf size in alfalfa. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 199-208, 2016.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.
- WANI, S. H. et al. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **The Crop Journal**, v. 4, p. 162-176, 2016.

- WOO, D. H. et al. *Arabidopsis lenc1* mutant displays reduced ABA accumulation by low *AtNCED3* expression under osmotic stress. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.140-147, 2011.
- YIN, X. et al. Overexpression of a novel MYB-related transcription factor, *OsMYBRI*, confers improved drought tolerance and decreased ABA sensitivity in rice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 490, n. 9, p. 1355-1361, 2017.
- ZANDALINAS, S. M. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n. 2, p. 1-11, 2018.
- ZANELLA, M. et al. β -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 6, p. 1819-1826, 2016.
- ZARGAR, S. M. et al. Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. **Plant Gene**, v. 11, p. 154-159, 2017.
- ZHANG, M. et al. Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 45, p. 1-10, 2018.
- ZHANG, X. et al. De novo transcriptome assembly and co-expression network analysis of *Cynanchum thesioides*: Identification of genes involved in resistance to drought stress. **Gene**, v. 710, p. 375-386, 2019.
- ZHOU, X. et al. Identification, characterization, and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in *Brachypodium distachyon*. **Functional and Integrative Genomics**, v. 18, n. 6, p. 709-724, 2018.
- ZHU, J.-K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.
- ZOU, J.-J. et al. Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase CPK10 Functions in Abscisic Acid- and Ca^{2+} -Mediated Stomatal Regulation in Response to Drought Stress. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1232-1243, 2010.

ARTIGO 2: Perfil da expressão relativa de genes das famílias NCED, DREB e MET em clones contrastantes de *Eucalyptus* spp. sob diferentes regimes hídricos.

ARTIGO 2: Perfil da expressão relativa de genes das famílias NCED, DREB e MET em clones contrastantes de *Eucalyptus* spp. sob diferentes regimes hídricos.

RESUMO

Mais da metade da área plantada de eucalipto no Brasil está sob áreas sujeitas à algum grau de déficit hídrico. Isso faz com que as diversas espécies plantadas no país apresentem estratégias diferentes para sobrevivência nessas condições adversas, muitas delas reguladas em níveis transcricionais. Com o objetivo de avaliar como a expressão de genes de três famílias, com respostas conhecidas ao estresse, se comportam em clones contrastantes de eucalipto sob déficit hídrico, análises de qPCR foram feitas em oito tratamentos diferentes. Os genes e os clones avaliados foram, respectivamente, *EgrDREB2*, *EgrNCED3* e *EgrMET1* e VM01 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) e VM05 (*E. urophylla*). Visando também identificar os genes pertencentes à essas famílias e em quais tecidos de eucalipto eles são comumente expressos, análises de expressão relativa foram realizadas na plataforma Eucenie.org, para NCED, DREB e MET. Os resultados obtidos revelaram 15 genes da família NCED, 21 da família DREB e 169 da família MET, com expressão predominante em raízes e tecidos vasculares. Os dados obtidos da qPCR demonstram que os clones VM01 e VM05 têm expressão diferenciada entre eles e entre os tratamentos de déficit hídrico, sendo que a principal delas foi observada na expressão do gene *EgrMET1*. Os resultados indicam também que o clone VM01 percebe o estresse pelo menos 24 horas antes do clone VM05, além de ter uma melhor recuperação em condições de reestabelecimento da irrigação. Em contrapartida, o clone VM05 demonstrou estar sob controle epigenético, de uma maneira ainda não compreendida. Esses dados e os genes identificados podem ser usados em estudos futuros sobre tolerância ao déficit hídrico em eucalipto, com potencial para atuar em programas de melhoramento desta espécie.

Palavras-chave: RT- qPCR. Déficit hídrico. Eucalipto.

ABSTRACT

More than half of the planted area of eucalyptus in Brazil is under areas subject to some degree of water deficit. This causes the different species planted in the country to present different survival strategies in these adverse conditions, many of them regulated at transcriptional levels. With the objective of evaluating how the expression of genes from three families with known responses to stress behave in contrasting clones of eucalyptus under water deficit, qPCR analyzes were performed in eight different treatments. The evaluated genes and clones were, respectively, EgrDREB2, EgrNCED3 and EgrMET1 and VM01 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) and VM05 (*E. urophylla*). In order to identify the genes belonging to these families and in which eucalyptus tissues they are commonly expressed, relative expression analyzes were performed on the Eucgenie.org platform for NCED, DREB and MET. The results obtained revealed 15 genes from the NCED family, 21 from the DREB family and 169 from the MET family, with predominant expression in vascular roots and tissues. The data obtained from qPCR demonstrate that the clones VM01 and VM05 have different expression between them and among the treatments of water deficit, the main one of which was observed in the expression of the EgrMET1 gene. The results also indicate that clone VM01 perceives stress at least 24 hours before clone VM05, and has a better recovery under irrigation reestablishment conditions. In contrast, clone VM05 has been shown to be under epigenetic control, in a manner not yet understood. These data and the genes identified can be used in future studies on tolerance to water deficit in eucalyptus, with potential to work in breeding programs of this species.

Keywords: RT-qPCR. Drought stress. Eucalyptus.

INTRODUÇÃO

Aproximadamente um terço da área terrestre é árida e semiárida, além de ocorrerem eventos climáticos extremos, como secas inesperadas na maioria das outras áreas (FANG; XIONG, 2015). A redução na disponibilidade de água é o maior agravante da produtividade agrícola mundial, principalmente no setor florestal, que apresenta crescente expansão para áreas mais secas (HODECKER et al., 2018). O eucalipto (*Eucalyptus* spp. [Myrtaceae]) é a árvore que mais sofrerá com essas expansões, pois é a espécie lenhosa mais plantada no Brasil (IBÁ, 2019). Os diversos clones e híbridos desta espécie podem possuir capacidade de sobreviver em regiões com baixa disponibilidade hídrica, como o *E. urophylla* x *E. camaldulensis*; entretanto, essa adaptabilidade em sobreviver em regiões limitantes não é comum a todas as plantas (MARTINS et al., 2018; MYBURG et al., 2014). Aliado à característica de plasticidade genética de algumas espécies, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e engenharia genética podem auxiliar no desenvolvimento de híbridos mais tolerantes ao estresse (CHANG et al., 2018; LAWLOR, 2012).

À medida que a disponibilidade de água diminui no solo, as plantas ativam mudanças na transcrição, onde conseguem se reprogramar para sobreviver com pouca água. Esse evento de sinalização envolve vias dependentes e independentes de ácido abscísico (ABA) (NGARA et al., 2018). Em resposta ao estresse, a biossíntese de ABA é estimulada e este fitormônio passa a regular o balanço hídrico da planta via controle da abertura estomática e ativação de genes de tolerância ao estresse (FUJITA et al., 2011; MARINHO et al., 2019; WANI et al., 2016).

Duas cascatas de sinalização, envolvendo o ABA, podem ser ativadas em resposta ao déficit hídrico. A via dependente de ABA é mediada pelo elemento de resposta ao ABA (ABRE) e a via independente é regulada pelo elemento de resposta à desidratação (DRE) (DASGUPTA; DHARANISHANTHI, 2017; VINSON et al., 2018).

O acúmulo do ABA induzido pelo déficit hídrico pode resultar da ativação de genes envolvidos na sua biossíntese, como o gene da 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenases (NCED). Essa enzima catalisa a etapa mais limitante da taxa de síntese desse hormônio, a clivagem dos carotenoides 9-*cis*-neoxantina e 9-*cis*-violaxantina para produzir xantoxina, composto que vai ser metabolizado em ABA (XIONG; ZHU, 2003). Já na via independente, os genes responsivos ao estresse possuem um elemento conservado na parte promotora (DRE). Proteínas ligam-se a esta região e ativam a expressão gênica em respostas à vários estresses, entre eles o déficit hídrico (MIZOI et al., 2013; NGARA et al., 2018; OH et al., 2015; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 1994). A família gênica DREB é um dos grupos mais importantes

desta rota e pertencem à família de fatores de transcrição ERF (do inglês *ethylene responsive element binding factors*). Genes dessa família são classificados como genes de resposta precoce, ativados rapidamente e de maneira transitória (ZHU et al., 2002). Em resposta ao déficit hídrico os genes da subclasse DREB2 são induzidos e atuam na transdução do sinal de estresse, ativando diversos genes (AGARWAL et al., 2006).

Em nível molecular, são mais conhecidas as respostas ao déficit hídrico reguladas pelo ABA, entretanto, estresses ambientais também podem causar mudanças epigenéticas no genoma, sendo a metilação o processo que mais causa alterações na expressão gênica, dificultando ou induzindo o acesso ao gene à ser expresso (ARIKAN; OZDEN; TURGUT-KARA, 2018; SAH; REDDY; LI, 2016). A adição do grupo metil ao DNA ou às histonas ocorre via ação das enzimas metiltransferases, como a MET1 (*DNA metiltransferase 1*), processo que não modifica a sequência de nucleotídeos (ZHANG; LANG; ZHU, 2018). As alterações induzidas epigeneticamente são reversíveis e dependem da intensidade do estresse e da espécie (BARTELS et al., 2018; KIM et al., 2012). Estudos já revelaram que a metilação de histonas é capaz de ativar genes-chave da biossíntese do ABA, como o *NCED3*, entretanto os mecanismos envolvidos nessa regulação ao estresse ainda não estão claros (KIM et al., 2015).

O conhecimento da base molecular das respostas à escassez de água permite o entendimento do processo com novas perspectivas e oportunidades para melhorar as plantas cultivadas (JAIN et al., 2019). A análise da expressão gênica é uma das principais técnicas que podem ser adotadas para entender essas respostas das plantas ao déficit hídrico. Estudar os níveis de expressão permite identificar em qual tecido, estágio de desenvolvimento e em quais fases do estresse cada gene está mais ou menos ativo (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Com base no fato de que a tolerância vegetal ao estresse compreende uma rede de características moleculares regulada por muitos genes, este trabalho teve como objetivo avaliar o padrão de expressão dos genes de três famílias em plantas de eucalipto, conhecidas por induzirem respostas ao déficit hídrico. As famílias selecionadas para as análises gerais foram *NCED* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*), *DREB* (*DRE-Binding Protein*) e *MET* (*DNA Methyltransferase*) e os genes selecionados em cada família, para quantificação da expressão via qPCR, foram *EgrDREB2* (*DRE-Binding Protein 2*), *EgrNCED3* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3*) e *EgrMET1* (*DNA Methyltransferase 1*). A expressão foi quantificada em oito regimes hídricos e em dois materiais genéticos contrastantes, o clone VM01 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) e o clone VM05 (*E. urophylla*).

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do material vegetal e imposição do déficit hídrico

O material vegetal utilizado para as análises foi coletado segundo descrição no item “Material e Métodos” do Artigo 1. A nomenclatura dos tratamentos também manteve-se similar à descrita anteriormente.

Perfil de expressão das famílias NCED, DREB e MET

A expressão relativa dos genes pertencentes às famílias NCED (domínio *NCED*), DREB (Domínio *DREB*) e MET (domínio *L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein/multiple*) em *Eucalyptus* foi determinada pela análise de bancos de dados públicos disponíveis na plataforma Eucgenie.org (<https://eucgenie.org>). O banco de dados utilizado foi o *E. grandis Tissues exAtlas*, contendo nove bibliotecas de *E. grandis*.

Extração de RNA total

Para a extração de RNA foram utilizadas amostras do segundo par de folhas completamente expandidas, de acordo com o protocolo proposto por Chang, Puryear e Cairney (1993), modificado. Foram utilizadas triplicatas biológicas de plantas dos dois clones (VM01 e VM05) para todos os tratamentos.

Amostras de 200 mg de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido e tratadas com 950 µL de tampão CTAB (2% p/v de CTAB; 2% p/v de PVP; 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 25 mM de EDTA pH 8,0; 2,0 M de NaCl; 0,5 g.L⁻¹ de espermidina) contendo 60 µL de β-mercaptoetanol, pré-aquecido à 65°C por 10 minutos. Após homogeneizar as amostras por inversão durante dois minutos, estas foram incubadas em banho-maria à 65°C por 15 minutos, sendo agitadas por inversão a cada 5 minutos. Após esse período, foram adicionados 950 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram agitadas por inversão durante 10 minutos, até adquirirem um aspecto leitoso. Em seguida, foram centrifugadas à 9.000g por 4 minutos, à 4°C, de onde foi coletado o sobrenadante, seguindo para nova lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), centrifugação e coleta do sobrenadante. Após esses processos, ¼ do volume de cloreto de lítio 10 M foi adicionado às amostras, que ficaram incubadas por 5 horas à 4°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas à 9.000g por 30 minutos, à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet) foi ressuspensos em 500 µL de tampão SSTE (1,0 M de NaCl; 0,5% de SDS; 10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de

EDTA pH 8,0) pré-aquecido à 37°C. Foram adicionados 500 µL de isopropanol (-20 °C) e as amostras foram mantidas à -20°C por uma hora. Após esse período, seguiram para centrifugação à 10.000g por 20 minutos, à 4°C; o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 250 µL de etanol 75% (-20°C), via centrifugação por 10 minutos à 10.000g, 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet lavado em 250 µL de etanol 100% (-20°C), da mesma maneira. Após as lavagens, o pellet passou por secagem à 37°C por aproximadamente 5 minutos e foi ressuspendido em 25 µL de água milli-Q tratada com DEPC (dietilpirocarboneto).

Preparo das amostras de RNA

Para a remoção do DNA genômico, as amostras extraídas foram tratadas com o *Kit Turbo DNase-free*TM (Invitrogen[®]) segundo recomendações do fabricante.

A integridade do RNA extraído foi avaliada via eletroforese, em gel de agarose 1% e a qualidade do material. foi analisada em espectrofotômetro NanoDrop 1000 UV (Thermo Fisher Scientific[®]).

A partir do RNA tratado, foi realizada a síntese do cDNA com o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems[®]), segundo recomendações do fabricante. Para a reação foram utilizados 1000 ng de RNA. O cDNA obtido foi diluído 5x para as análises de expressão.

Análise da expressão gênica via RT-qPCR

Para as análises de expressão gênica foram utilizados os genes de referência *SAND* e *PP2A-3* (MARTINS et al., 2018) e os genes de interesse *EgrDREB2*, *EgrNCED3* e *EgrMET1*. As informações gerais sobre os genes utilizados estão resumidas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Informações gerais sobre os genes analisados nas reações de qPCR e os genes utilizados para normalização dos dados.

GENES	DEFINIÇÃO	ACESSO	SEQUÊNCIA DO PRIMER
<i>EgrDREB2</i>	<i>DRE-Binding Protein 2</i>	<i>Eucgr.G03094.2</i>	F: AGTGACTATGCCGTGGATGAC R: GCTCCATCTTGACATCTGAGG
<i>EgrNCED3</i>	<i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3</i>	<i>Eucgr.F01409</i>	F: GAGCGAGAGATTTTGAGGAACC R: CAGAGCAGCGAGAGAATAAGCA
<i>EgrMET1</i>	<i>DNA Methyltransferase 1</i>	<i>Eucgr.I00036.1</i>	F: CGACAACAACCAGGCTTATCA R: TCCTCTTGCTCCTCAATGTCA
<i>SAND</i>	<i>SAND protein</i>	<i>Eucgr.B03031.1</i>	F: TTGACGAGCCTCTTTATCCAAT R: TAGCAGGCAATACATCACCAAG
<i>PP2A-3</i>	<i>Phosphatase Subunit 2A-3</i>	<i>Eucgr.B03386.1</i>	F: TTGACGAGCCTCTTTATCCAAT R: TAGCAGGCAATACATCACCAAG

As análises foram feitas para os dois clones e para todos os tratamentos, em triplicata biológica. Nas placas, foi incluso também um interensaio com um *pool* de todas as amostras, para garantir a reprodutibilidade técnica. Para as quantificações, 10,0 µL da reação, constituídos de 1,0 µL de cDNA diluído; 0,2 µL de cada *primer* (10 µM); 5,0 de SYBR[®] Green (*Applied Biosystems*); 3,6 µL de água milli-Q tratada com DEPC, foram analisados no equipamento ABI PRISM 7500 Real Time PCR (*Applied Biosystems*). O ciclo da reação foi de 130 minutos, para todos os genes amplificados: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 60 °C.

Análise dos dados de qPCR

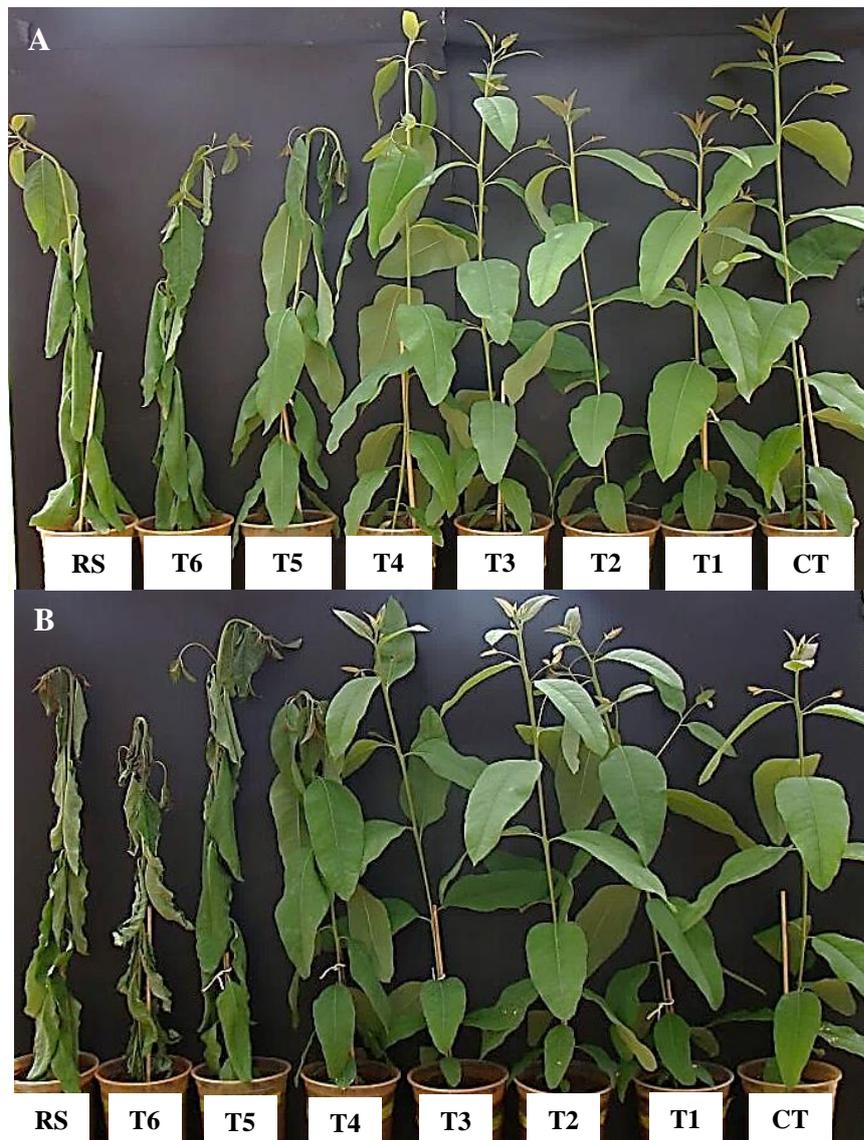
A normalização dos dados foi feita de acordo a expressão dos dois genes de referência utilizados (*SAND* e *PP2A-3*) e a especificidade dos *primers* foi analisada pela curva de dissociação (Curva de *Melting*) gerada durante o ciclo. As análises foram feitas em triplicatas biológicas, para cada um dos tratamentos e para a amostra interensaio. Para quantificação relativa da expressão foi utilizada a fórmula de Pfaffl (2001). Os cálculos foram feitos em planilhas do Microsoft[®] Excel e os resultados da expressão gênica foram plotados em gráficos.

RESULTADOS

Estabelecimento do déficit hídrico

Após o período de estresse, foram coletadas amostras do tecido foliar de plantas dos clones VM01 e VM05, para todos os tratamentos. Na Figura 2.1 é possível observar a morfologia da parte aérea das plantas à medida que o déficit hídrico avançava.

Figura 2.1 – Fotografias dos clones VM01 (A) e VM05 (B) após a imposição dos tratamentos de déficit hídrico.

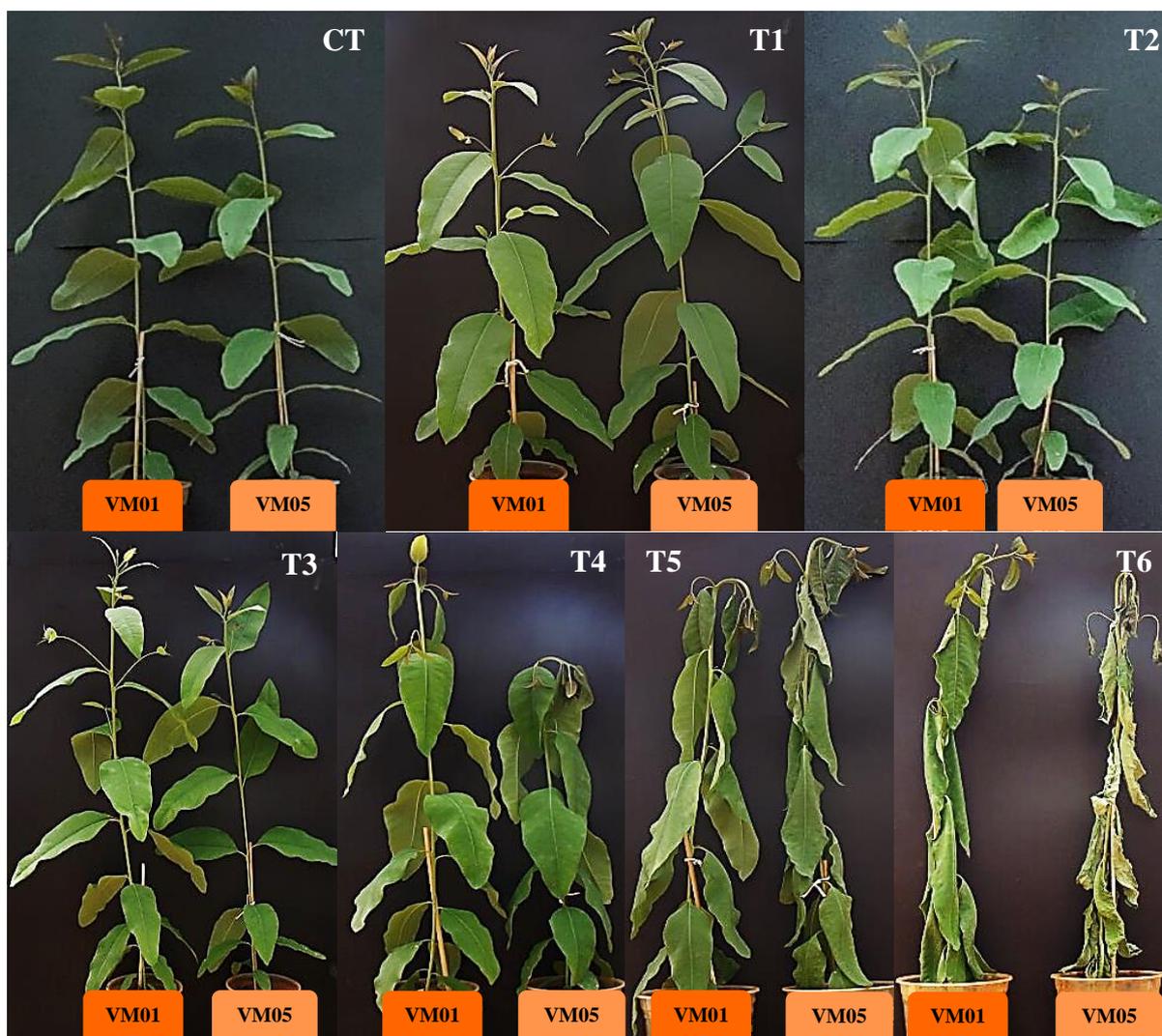


Legenda: (A) Clone VM01; (B) Clone VM05. CT (controle) = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS (resiliência) = 6 dias de estresse + 2 dias de irrigação.

Foto: Do autor (2018).

Visualmente, é possível concluir que a partir do quinto dia de déficit hídrico (T5) as plantas do clone VM01 estão com as folhas nitidamente murchas, padrão que já é observado nas plantas do clone VM05 a partir do quarto dia de déficit (T4). Essa diferença acentua-se ainda mais nos dias seguintes, à medida que a severidade do estresse aumenta. Para facilitar essa comparação entre os clones, plantas de todos os tratamentos (exceto RS) foram comparadas na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Fotografias comparando os clones VM01 e VM05, em plantas sempre irrigadas e plantas que sofreram estresse.

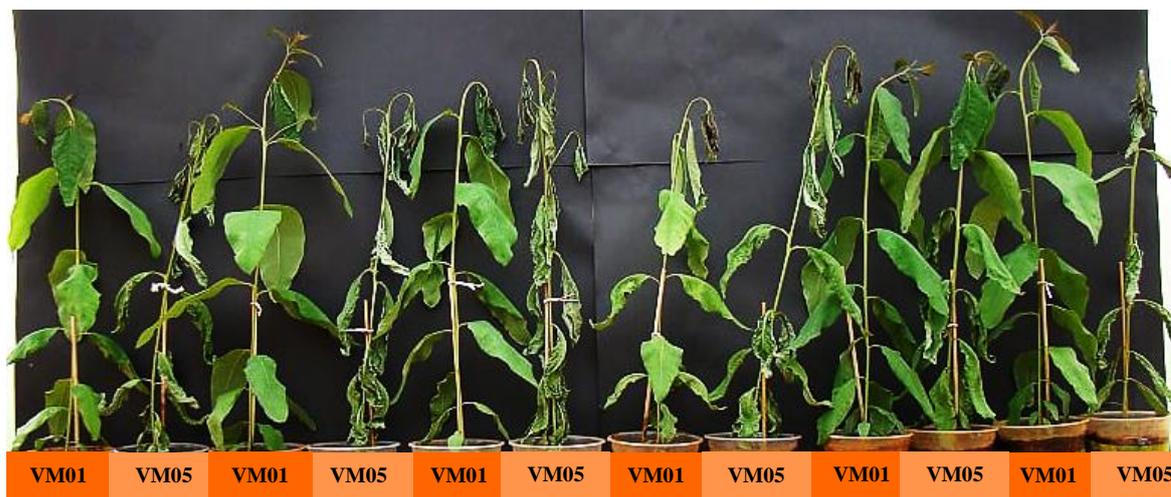


Legenda: CT (controle) = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse.

Foto: Do autor (2018).

Para avaliar como é a recuperação dos dois materiais vegetais após déficit hídrico severo, plantas dos dois clones foram comparadas após serem hidratadas por dois dias, após o período de 6 dias sem água (FIGURA 2.3).

Figura 2.3 – Fotografia comparando os clones VM01 e VM05 após dois dias de irrigação pós estresse (RS).



Legenda: RS (resiliência) = 6 dias de estresse + 2 dias de irrigação.

Foto: Do autor (2018).

Para cada tratamento foram selecionadas 12 plantas de cada um dos clones. Dessas plantas, três do clone VM01 e sete do clone VM05 não conseguiram se recuperar após a reidratação (RS), ou seja, permaneceram com as folhas debilitadas após o restabelecimento do fornecimento de água.

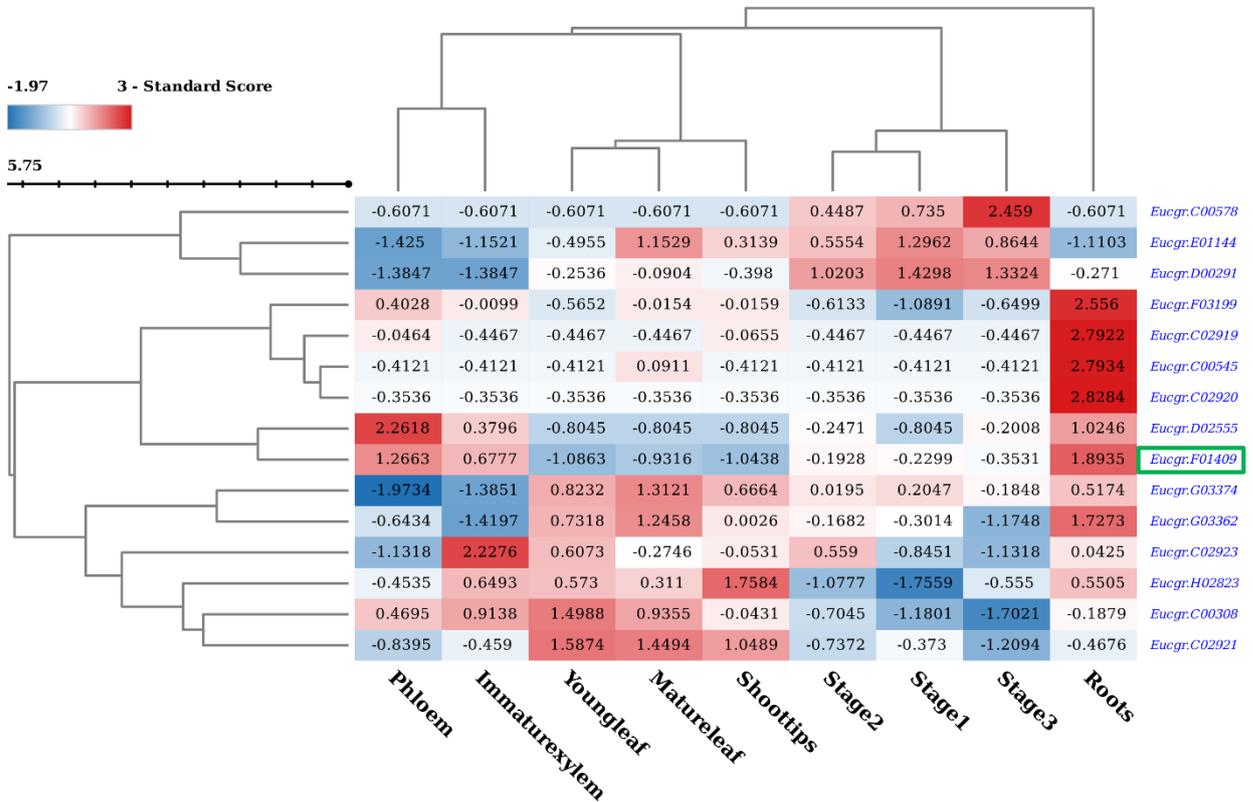
Expressão relativa das famílias NCED, DREB e MET

A análise do perfil das famílias NCED, DREB e MET revelou a expressão dos genes associados à elas em nove bibliotecas diferentes. Na família NCED foram identificados 15 genes; na família DREB, 21 genes e na MET, 169 genes. Os resultados foram expressos em escalas relativas (*z-score*) para todos os genes das famílias analisadas e para os genes selecionados para qPCR.

O perfil de expressão relativa dos genes da família NCED está demonstrado na Figura 2.4, para tecidos vasculares (*phloem*, *immature xylem*), parte aérea (*youngleaf*, *matureleafs*, *shoottips*), raiz (*roots*) e estágios de formação de flores (*stage 1*, *stage 2*, *stage 3*). Essas bibliotecas são as mesmas analisadas para os demais grupos de genes, pertencentes às outras

famílias. Os genes identificados foram agrupados também na árvore filogenética, de acordo com a correlação gênica e com as bibliotecas.

Figura 2.4 – Expressão relativa dos genes da família NCED em diferentes tecidos de eucalipto.



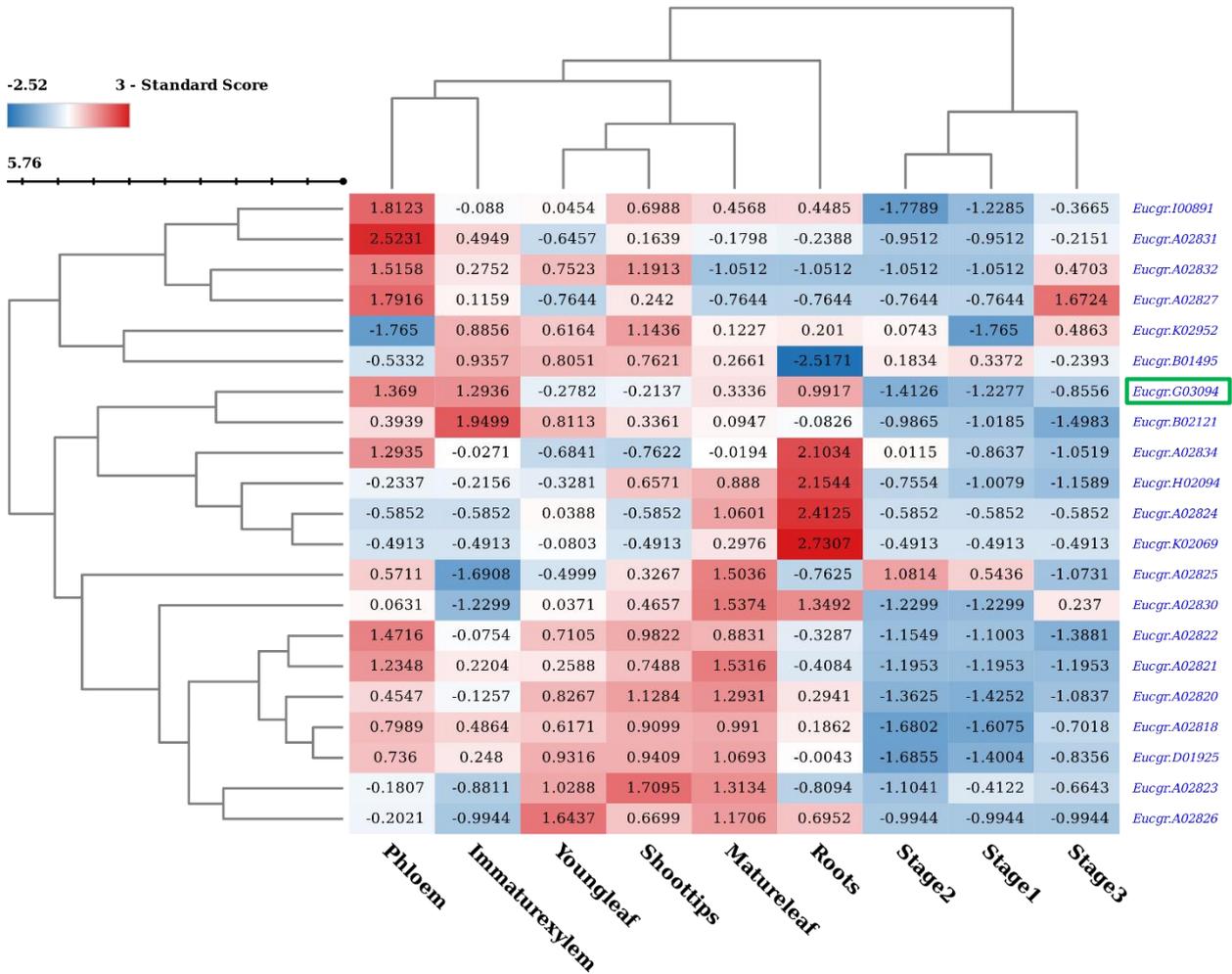
Legenda: As bibliotecas denominadas *Stage 1*, *Stage 2* e *Stage 3* correspondem à estágios iniciais e tardios do desenvolvimento de botões florais, definidos por Vining et al. (2015). O gene destacado na caixa verde corresponde ao gene selecionado para análise de qPCR (*EgrNCED3*). As diferenças na expressão gênica são observadas ao se comparar os genes dentro de uma mesma linha.

Os genes pertencentes à família NCED atuam diretamente na biossíntese de ABA, sendo que alguns grupos são responsivos à estresses abióticos específicos, como seca, temperaturas extremas e salinidade (ZHANG et al., 2008). De modo geral, a expressão dos genes variou muito entre os tecidos analisadas, sendo que as maiores taxas de expressão foram detectadas em raízes. O gene *Eucgr.F01409*, destacado em verde, foi o gene utilizado para quantificação da expressão, via qPCR, em tecidos foliares. Observando a Figura 2.4, percebe-se que esse gene, em condições normais de desenvolvimento, é mais expresso em raízes e tecidos vasculares, em comparação com os demais tecidos avaliados.

Os genes da família DREB atuam na rota independente de ABA e também podem ter sua expressão modulada por perturbações ambientais, de acordo com o subgrupo à qual

pertencem (LI et al., 2016). O perfil da expressão desses genes, identificados em eucalipto em diferentes tecidos e em condições não estressantes, está representado na Figura 2.5.

Figura 2.5 – Expressão relativa dos genes da família DREB em diferentes tecidos de eucalipto.



Legenda: As bibliotecas denominadas *Stage 1*, *Stage 2* e *Stage 3* correspondem à estágios iniciais e tardios do desenvolvimento de botões florais, definidos por Vining et al. (2015). O gene destacado na caixa verde corresponde ao gene selecionado para qPCR (*EgrDREB2*). As diferenças na expressão gênica são observadas ao se comparar os genes dentro de uma mesma linha.

Assim como observado na família NCED, alguns genes DREB têm elevada expressão nas raízes. Entretanto, um maior número de genes está expresso na parte aérea e no floema, em comparação com os genes da família NCED (FIGURA 2.4). Genes DREB parecem ser pouco expressos nos estágios finais de desenvolvimento, quando a planta já está na fase floração. O gene que teve sua expressão quantificada por qPCR foi o *Eugr.G03094.2* (destacado em verde). Em condições normais de desenvolvimento este gene é pouco expresso em tecidos mais jovens, tendo sua expressão concentrada em tecidos vasculares.

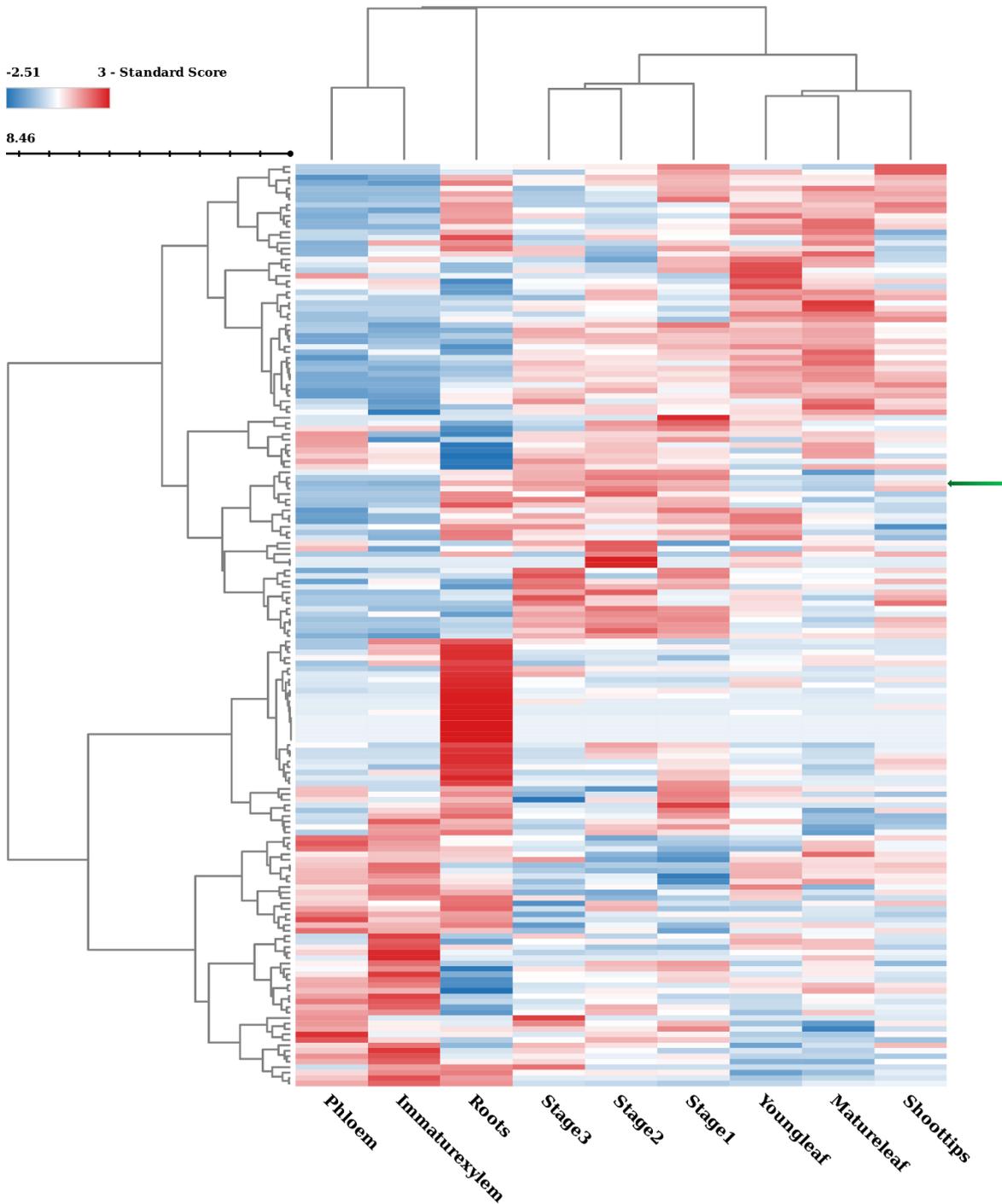
Por fim, o perfil de expressão também foi analisado para os genes da família MET. Esse grupo, foi o que teve o maior número de genes identificados. Os genes estão listados na Tabela 2.2 e o perfil de expressão na Figura 2.6. A ordem dos genes listados na Tabela corresponde à ordem com que eles aparecem na Figura.

Tabela 2.2 – Genes pertencentes à família MET, identificados em diferentes tecidos de eucalipto.

Eucgr.H02738	Eucgr.L02823	Eucgr.C03674	Eucgr.G01610	Eucgr.B00946	Eucgr.C00673
Eucgr.A00238	Eucgr.K01335	Eucgr.F04491	Eucgr.C03062	Eucgr.G02721	Eucgr.B02818
Eucgr.H02539	Eucgr.F01633	Eucgr.B03940	Eucgr.I01134	Eucgr.L02705	Eucgr.C00925
Eucgr.H01107	Eucgr.I00893	Eucgr.F00305	Eucgr.C00927	Eucgr.F00926	Eucgr.C03939
Eucgr.C03148	Eucgr.B00339	Eucgr.K02257	Eucgr.H00127	Eucgr.K02252	Eucgr.E01240
Eucgr.E00210	Eucgr.G00016	Eucgr.B02817	Eucgr.H03037	Eucgr.J01534	Eucgr.C00676
Eucgr.L03668	Eucgr.J02331	Eucgr.L01415	Eucgr.I00186	Eucgr.K02332	Eucgr.B00164
Eucgr.G03283	Eucgr.I02408	Eucgr.A02270	Eucgr.J00712	Eucgr.I02338	Eucgr.D02328
Eucgr.C00903	Eucgr.H04746	Eucgr.C00924	Eucgr.D02155	Eucgr.L01042	Eucgr.L01151
Eucgr.F02036	Eucgr.F04459	Eucgr.E02401	Eucgr.H03343	Eucgr.I00532	Eucgr.I02052
Eucgr.L01687	Eucgr.I02337	Eucgr.B02685	Eucgr.G01635	Eucgr.F02436	Eucgr.H04719
Eucgr.H03330	Eucgr.K01102	Eucgr.H03325	Eucgr.J03135	Eucgr.D02245	Eucgr.G02713
Eucgr.G02086	Eucgr.F02335	Eucgr.L01041	Eucgr.F00334	Eucgr.D02247	Eucgr.H03324
Eucgr.A00430	Eucgr.E00212	Eucgr.F04286	Eucgr.G02091	Eucgr.D02595	Eucgr.H04401
Eucgr.K01626	Eucgr.C03787	Eucgr.B00481	Eucgr.F03163	Eucgr.G01632	Eucgr.H03342
Eucgr.H03323	Eucgr.H03531	Eucgr.H00927	Eucgr.F04260	Eucgr.F03783	Eucgr.A00269
Eucgr.G02088	Eucgr.C03795	Eucgr.K02255	Eucgr.G01634	Eucgr.K00230	Eucgr.K02250
Eucgr.C01077	Eucgr.I01084	Eucgr.G02963	Eucgr.C00449	Eucgr.G00019	Eucgr.F01088
Eucgr.A02808	Eucgr.K03462	Eucgr.E02617	Eucgr.F04073	Eucgr.C03932	Eucgr.L03517
Eucgr.B01475	Eucgr.C03668	Eucgr.F01450	Eucgr.H03336	Eucgr.K02253	Eucgr.K02994
Eucgr.G01417	Eucgr.B03211	Eucgr.A00073	Eucgr.I01735	Eucgr.K01627	Eucgr.K02256
Eucgr.J02466	Eucgr.H03338	Eucgr.I01240	Eucgr.H04109	Eucgr.H03340	Eucgr.L01416
Eucgr.B02682	Eucgr.L01414	Eucgr.C03802	Eucgr.I02378	Eucgr.I01724	Eucgr.F04285
Eucgr.B02884	Eucgr.B02684	Eucgr.I01716	Eucgr.I01766	Eucgr.L00974	Eucgr.H03344
Eucgr.F00306	Eucgr.G03084	Eucgr.C03680	Eucgr.J01532	Eucgr.H03327	
Eucgr.E02364	Eucgr.F01568	Eucgr.C03934	Eucgr.C03667	Eucgr.G01628	
Eucgr.K02808	Eucgr.L03085	Eucgr.G02508	Eucgr.E01134	Eucgr.F03342	
Eucgr.C02260	Eucgr.C03684	Eucgr.A01742	Eucgr.J03201	Eucgr.G01625	
Eucgr.H04095	Eucgr.I00036	Eucgr.B02886	Eucgr.B02883	Eucgr.K02249	

Legenda: O gene destacado de verde corresponde ao gene selecionado para qPCR (*EgrMET1*).

Figura 2.6 – Expressão relativa dos genes da família MET em diferentes tecidos de eucalipto.



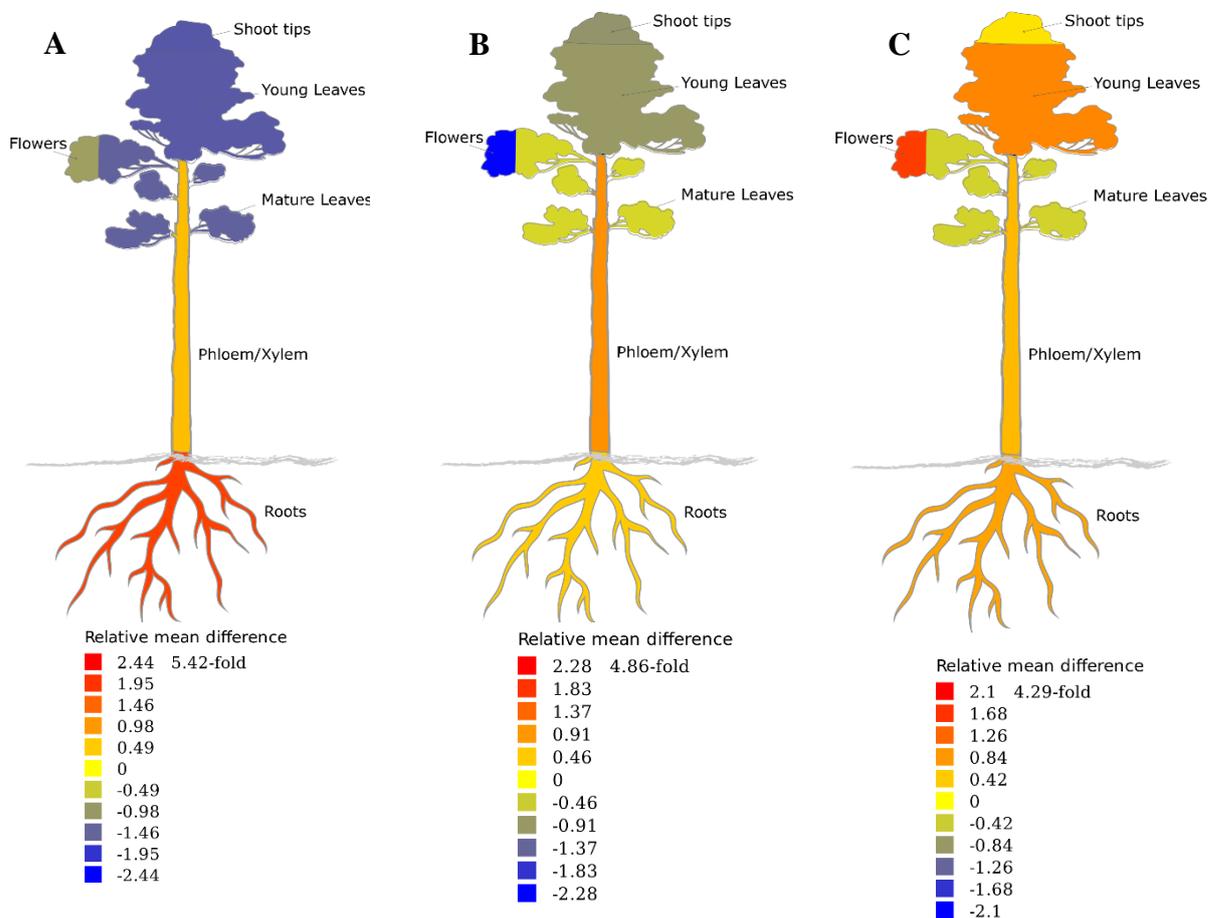
Legenda: As bibliotecas denominadas *Stage 1*, *Stage 2* e *Stage 3* correspondem à estágios iniciais e tardios do desenvolvimento de botões florais, definidos por Vining et al. (2015). O gene apontado pela seta verde corresponde ao gene selecionado para análise de qPCR (*EgrMET1*). As diferenças na expressão gênica são observadas ao se comparar os genes dentro de uma mesma linha.

Com relação à distribuição dos genes nos tecidos analisados, não é possível determinar um padrão geral de expressão, pois ela difere muito em cada gene. O gene apontado na imagem corresponde ao *EgrMET1*, que teve sua expressão quantificada por qPCR. Com a observação

da Figura 2.6 é possível concluir que, em condições normais, esse gene é pouco expresso no tecido foliar, concentrando sua expressão nas raízes e nas flores.

Para facilitar a visualização da expressão dos genes selecionados em cada família (*EgrNCED3*, *EgrDREB2* e *EgrMET1*), o padrão da expressão relativa foi demonstrado na Figura 2.7. Nesta imagem, observa-se que a expressão dos três genes é mais acentuada nas raízes e nos tecidos vasculares. Apenas o gene *EgrMET1* é expresso em todas as partes da plantas, em valores similares.

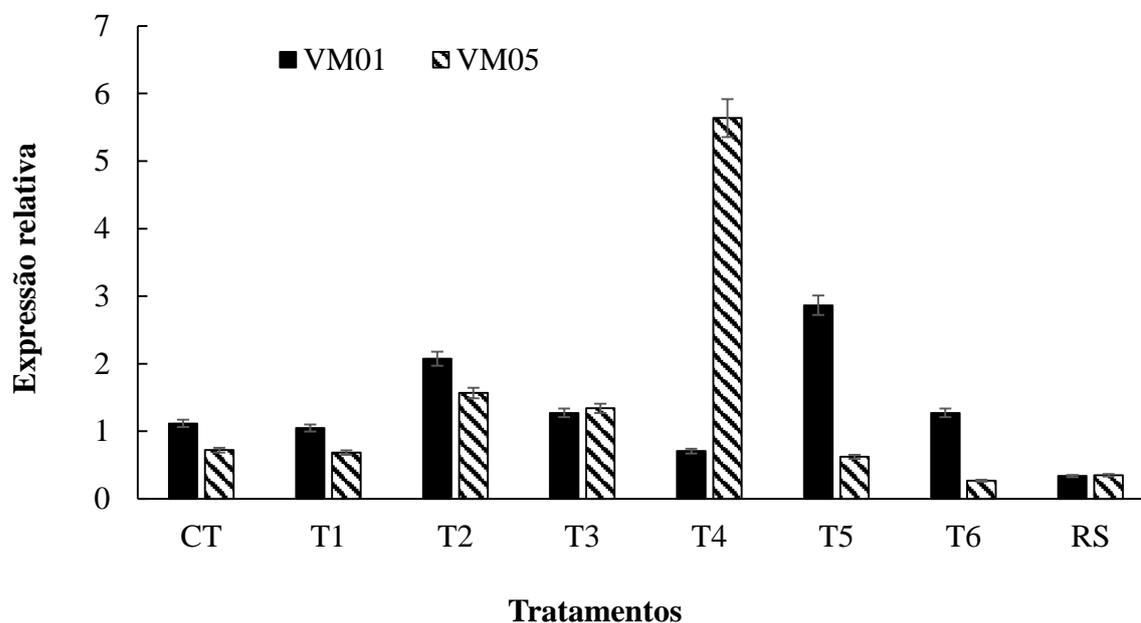
Figura 2.7 – Expressão relativa do genes *EgrNCED3* (A), *EgrDREB2* (B) e *EgrMET1* (C) em diferentes tecidos vegetais e em condições não estressantes.



Quantificação da expressão dos genes *EgrNCED3*, *EgrDREB2* e *EgrMET1*

Para avaliar se a expressão gênica dos genes *EgrNCED3*, *EgrDREB2* e *EgrMET1* era alterada em condições de déficit hídrico em dois clones contrastantes de eucalipto, foram feitas análises de RT-qPCR com o tecido foliar dos materiais em oito condições hídricas diferentes. O Gráfico 2.1 expressa os valores relativos dessa quantificação para o gene *EgrNCED3*.

Gráfico 2.1 – Expressão relativa do gene *EgrNCED3* para os clones VM01 e VM05, em diferentes regimes hídricos.

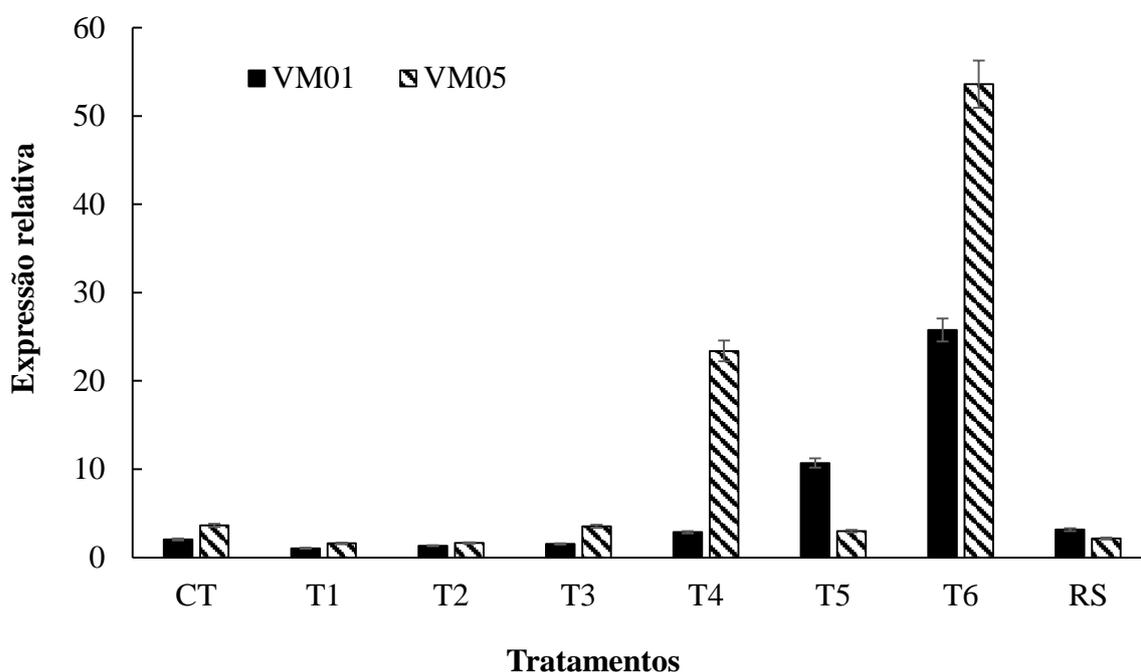


Legenda: CT = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

A expressão relativa do gene *EgrNCED3* variou entre os tratamentos e essa variação foi maior entre os clones nos últimos dias de déficit hídrico (T4-T6). No primeiro dia sem água (T1) a expressão desse gene foi similar à expressão nas plantas sempre irrigadas (CT), sendo um pouco mais baixa no clone VM05. A partir do segundo dia sem água (T2), o padrão de expressão alterou-se entre os clones e essa alteração manteve-se até o T6. Plantas do clone VM01 aumentaram a expressão do *EgrNCED3* após dois dias sem água, diminuíram em T3 e T4 e voltaram a aumentar em T5, onde apresentaram expressão 4x maior em comparação com o tratamento anterior. Já nas plantas do clone VM05, a expressão desse gene aumentou de T2 ao T4 e reduziu em T5 e T6. Nas plantas reidratadas após o déficit hídrico (RS) a expressão foi baixa em ambos os clones e mantiveram-se similares. Para o gene *EgrNCED3*, a principal diferença na expressão, comparando os dois clones, foi após quatro dias sem água (T4), quando a expressão desse gene foi 6x maior no clone VM05 do que no clone VM01.

Para o gene *EgrDREB2*, o padrão de expressão nos dois clones de eucalipto está demonstrado no Gráfico 2.2.

Gráfico 2.2 – Expressão relativa do gene *EgrDREB2* para os clones VM01 e VM05, em diferentes regimes hídricos.



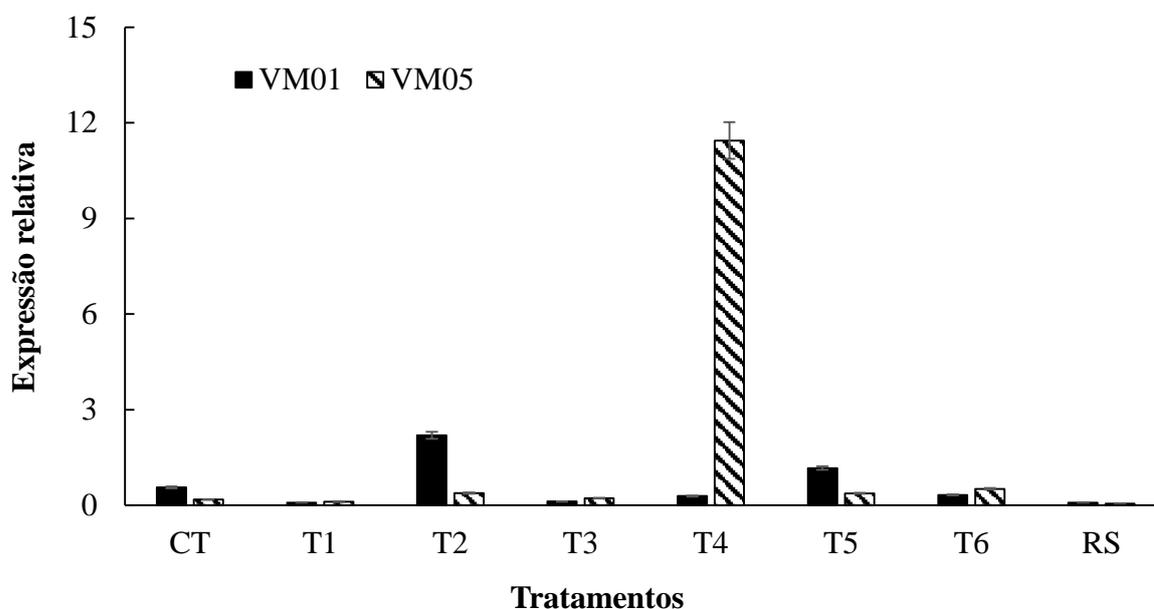
Legenda: CT = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

A expressão do gene *EgrDREB2* aumentou no clone VM01 de acordo com a progressão do estresse, sendo 20x maior no sexto dia de déficit hídrico (T6), quando comparado com a expressão no primeiro sem água (T1). Para o clone VM05, esse padrão de aumento ocorreu até o quarto dia de déficit hídrico (T4) quando o aumento de 20x na expressão foi observado; no quinto dia sem água (T5) a expressão do gene diminuiu drasticamente e no sexto dia (T6) voltou a aumentar, apresentando expressão 50x maior que plantas continuamente irrigadas (CT). Nas plantas reidratadas (RS), a expressão do *EgrDREB2* caiu nos dois clones e ficou similar à das plantas controle (CT).

O último gene analisado, *EgrMET1*, apresentou aumento na expressão apenas em alguns tratamentos, para os dois clones (GRÁFICO 2.3). Nas plantas do clone VM01, esse gene foi 2x mais expresso no tratamento T2 (dois dias sem água), em comparação com plantas do tratamento CT (sempre irrigado). Aumentos na expressão, para esse clone foram verificados novamente apenas no T5 (cinco dias sem água), onde a expressão do gene *EgrMET1* dobrou em relação ao tratamento anterior (T4). Nas plantas do clone VM5, a maior expressão desse gene foi no quarto dia sem água (T4). Nesse tratamento, o gene foi 12x mais expresso, em

comparação com plantas VM01 na mesma condição e em comparação com plantas VM05 que não passaram por déficit hídrico (CT).

Gráfico 2.3 – Expressão relativa do gene *EgrMET1* para os clones VM01 e VM05, em diferentes regimes hídricos.



Legenda: CT = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

DISCUSSÃO

Morfologia e déficit hídrico

Com a observação da morfologia da parte aérea (FIGURA 2.1 e FIGURA 2.2) é possível concluir que as plantas do clone VM05 estão sendo mais afetadas pela falta de água do que as do clone VM01, à medida que o déficit hídrico torna-se mais severo. A murcha foliar é mais nítida a partir do T5 no clone VM01 e à partir do T4 no clone VM05 e fica mais acentuada à medida que os dias sem água persistem. No último dia de estresse (T6), as folhas das plantas VM05 estão amarelas, com aspecto muito seco e com o ápice caulinar totalmente curvado. Esse padrão não é observado nas plantas VM01 sob as mesmas condições, apesar delas também estarem com características típicas de plantas estressadas.

A recuperação das plantas após o estresse (RS) também foi diferente para os dois clones (FIGURA 2.3). O número de plantas que não conseguiram se recuperar do déficit hídrico foi

menor para o clone VM01 que para o VM05, além das folhas deste último clone estarem mais secas e murchas entre as plantas que sobreviveram. Esses resultados sugerem que o clone VM01 é mais resiliente em condições de déficit hídrico que o clone VM05, ou seja, é mais capaz de adaptar-se à escassez de água. Além disso, ele aparenta também ser capaz de se reestabelecer mais rápido que o clone VM05, após uma situação estressante.

Expressão gênica

Reduções na disponibilidade de água desencadeiam respostas metabólicas e alterações no padrão de desenvolvimento das culturas. Essas respostas ocorrem em função das mudanças no padrão de expressão gênica (FAN et al., 2018; SIMURA et al., 2018). Para essas condições, a expressão de vários genes já foi relatada como importante no processo de regulação das respostas ao déficit hídrico, entre eles destacam-se os genes pertencentes à famílias relacionadas à sinalização do ABA, como NCED e DREB, e os genes que regulam modificações epigenéticas, como MET, que podem ser considerados uma rota alternativa ao ABA (DEJONGHE; OKAMOTO; CUTLER, 2018; MARTINS et al., 2018). Com base nisso, o perfil de expressão de três genes representantes dessas famílias foi avaliado em clones de eucalipto, em diferentes dias de déficit hídrico. As análises mais específicas dessa expressão foram feitas com os genes selecionados, via RT-qPCR, uma vez que essa técnica é uma ferramenta amplamente utilizada para quantificar os níveis de expressão de transcritos específicos (LIU et al, 2014).

Vários genes responsivos ao déficit hídrico estão relacionados com o ABA, entretanto, os mecanismos que controlam os níveis desse hormônio não estão bem compreendidos. Em condições de estresse, a biossíntese de ABA é estimulada nos tecidos vegetativos, iniciando a transdução de sinais e promovendo respostas adaptativas (SAH; REDDY; LI, 2016). Quando o estresse diminui, as concentrações de ABA reduzem, através do catabolismo e da conjugação (LIM et al., 2015). A capacidade das plantas de controlar os níveis endógenos de ABA e regular a abertura estomática durante o estresse hídrico tem sido uma ferramenta útil para experimentos com tolerância à seca (FINKELSTEIN, 2013). A dinâmica da distribuição desse fitormônio é controlada por diversos genes, como observado na Figura 2.4, onde todos apresentam variações da expressão nos tecidos e entre as fases de desenvolvimento. Embora todos os genes apresentados nesta figura sejam relacionados à biossíntese de ABA, apenas alguns aumentam sua expressão em resposta ao déficit hídrico.

Para verificar se, em condições de déficit hídrico, a biossíntese de ABA está sob controle do gene *EgrNCED3*, sua expressão foi determinada em uma reação de qPCR. Este gene foi escolhido pois codifica uma enzima limitante da biossíntese de ABA, induzida por estresse (KALLADAN et al., 2019). Acredita-se que essa enzima acumula-se à medida que os níveis de ABA aumentam, mas diminuem com o alívio do estresse ou com a reidratação (ENDO et al., 2008; SILVA et al., 2016). Nos clones analisados, a expressão do *EgrNCED3* (qPCR) foi relativamente baixa, em comparação com outros genes avaliados, e variou muito entre os clones e os tratamentos, principalmente em T4, T5 e T6 (últimos dias de déficit hídrico) (GRÁFICO 2.1). Esse padrão obtido, indica que em tecidos foliares, a expressão do *EgrNCED3* não tem aumentos acentuados em resposta ao déficit hídrico.

Nas reações de qPCR para o clone VM01, os maiores valores da expressão do gene *EgrNCED3* aconteceram no segundo e no quinto dia de déficit hídrico (respectivamente T2 e T5). Já para as plantas no clone VM05, a variação da expressão *EgrNCED3* foi mais acentuada no tratamento T4. Vários estudos sugerem que a ativação deste gene ocorre de maneira rápida e transitória em condições de déficit hídrico, quando sua expressão aumenta significativamente (SOUZA et al., 2016; WOO et al., 2011; XIONG; ZHU, 2003; ZANG et al., 2006).

Como os níveis de ABA aumentam em resposta ao déficit hídrico, esperava-se que os níveis de expressão do gene *EgrNCED3* também aumentassem. Isso ocorreu nos dois clones, no segundo dia de déficit hídrico (T2), sendo que a expressão no VM01 estava um pouco mais acentuada. Esperava-se que esse aumento progredisse com o avanço do estresse, entretanto, o que foi observado é que a expressão apresentou modulação com o passar dos dias, com aumentos significativos, seguidos por quedas acentuadas. Essas variações ocorreram com apenas um dia de diferença entre os tratamentos, reforçando a ideia de que a expressão do *EgrNCED3* nesses clones de eucalipto também é regulada de forma transitória e com relativa rapidez. Com o reestabelecimento da irrigação (tratamento RS), a expressão do *EgrNCED3* reduziu em resposta, em ambos os clones.

Uma provável explicação para esse aumento não ter se mantido ao longo do déficit hídrico é que, embora a enzima NCED seja considerada chave no processo biossintético de ABA, a concentração local desse fitormônio depende do equilíbrio entre biossíntese, catabolismo/inativação e transporte entre células e tecidos (OLLAS; DODD, 2016). É comum que vias biossintéticas sejam reguladas pelos seus produtos finais, inclusive a via do ABA (XIONG; ZHU, 2003; YU et al., 2019). Uma hipótese para as variações observadas na expressão do *EgrNCED3* nos clones VM01 e VM05 é que o ABA regulou negativamente o seu acúmulo, ativando enzimas catabólicas quando os níveis estavam mais altos. Quando a

concentração de ABA aumenta rapidamente, o excesso precisa ser degradado para ajustar os níveis (SEILER et al., 2011). Respostas similares já foram detectadas em outros estudos, onde a degradação do ABA foi estimulada pela aplicação de ABA exógeno ou em plantas transgênicas que super expressavam genes de sua rota biossintética (BRAY, 2002; ESTRADA-MELO et al, 2015; SEILER et al., 2011; QIN; ZEEVAART, 2002).

Análises de qPCR em tecidos foliares de amendoim, mostraram que genes envolvidos na biossíntese, transporte e catabolismo de ABA variaram em resposta à seca, sugerindo que esses processos são integrados e atuam para garantir a homeostase do ABA em resposta ao déficit hídrico (LONG et al., 2019). Um estudo com *Populus* sob déficit hídrico mostrou que o gene *NCED* foi regulado positivamente pelo aumento no conteúdo de ABA, assim como seu catabolismo, em resposta ao estresse (BRUNETTI et al., 2019). Além disso, a sinalização e a síntese de ABA ocorrem em resposta a vários elementos e genes, sendo apenas um, insuficiente para determinar a regulação da biossíntese. Essa regulação controlada por múltiplos fatores permite o ajuste da transcrição com a ação do ABA e com a plasticidade das espécies (OLLAS; DODD, 2016). Em situações em que o déficit hídrico é muito severo, a queda nos níveis de ABA também pode ser favorecida pelos danos severos induzidos pela falta de água (LONG et al., 2019; TAIZ et al., 2017).

Outra provável explicação para as modulações na expressão do *EgrNCED3* pode ser obtida comparando os dados da qPCR (GRÁFICO 2.1) com a expressão desse gene em condições normais (FIGURAS 2.4 e 2.7). É possível concluir que a participação desse gene no processo de biossíntese de ABA manteve-se pouca alterada sob déficit hídrico, pelo menos em tecidos foliares. Explicações possíveis são que outros genes, também da família *NCED*, são mais responsivos ao estresse que o gene *EgrNCED3* ou que o seu padrão de expressão não é alterado em folhas, apenas em raízes, onde naturalmente ele é mais expresso. Novas análises de qPCR podem ser feitas com outros genes ou em tecidos radiculares, a fim de comprovar essa hipótese.

Os genes responsivos ao déficit hídrico também interagem com as vias independentes de ABA e determinam as respostas ao estresse (PRUTHVI; NARASIMHAN; NATARAJA, 2014). Os fatores de transcrição DREB são os principais representantes dessa via e atuam na transdução de sinal, regulando positivamente a expressão de genes responsivos ao estresse (AGARWAL et al., 2006; MARINHO et al., 2019; TORRES et al., 2019). Entre os genes da família DREB, o *DREB2* é altamente induzido pela seca ou altas temperaturas (NGUYEN et al., 2016; YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014).

Ao analisar os perfis de expressão do gene *EgrDREB2* (qPCR) nos clones VM01 e VM05 (GRÁFICO 2.2), observa-se que eles apresentaram respostas rápidas e mais tardias a esse gene, além de uma expressão transitória do gene. Respostas variadas na expressão desse gene já foram relatadas em diferentes espécies, onde picos de expressão são seguidos por reduções na expressão ou a expressão mantém-se por longos períodos de déficit hídrico (LI et al., 2011; MARTINS et al., 2018; THIOUNE et al., 2017; JOVANOVIC et al., 2013; LI et al., 2017; ZANDKARIMI et al., 2015).

Nas plantas do clone VM01, a expressão do gene *EgrDREB2* aumentou conforme o déficit hídrico avançou. Aos seis dias de estresse (T6), a expressão gênica foi 20x maior do que aquela observada em plantas que ficaram apenas um dia sem água (T1). Em contrapartida, esse aumento de 20x na expressão foi detectado antes nas plantas do clone VM05, ao quarto dia de estresse (T4). Os aumentos na expressão do *EgrDREB2* são uma resposta à redução de água nas células e estão relacionados com a ativação de outros genes que garantem a manutenção das funções celulares em condições estressantes, como genes da biossíntese de osmoprotetores, proteínas LEA ou enzimas antioxidantes. Isso é um reflexo da indução coordenada de genes, comum em condições adversas (CHEN et al., 2007; KHAN, 2011). Hipóteses levantadas para as variações na expressão desse gene sob déficit hídrico são similares àquelas propostas para o gene *EgrNCED3*.

Além dos genes relacionados ao ABA, promotores de vários genes são regulados por processos de metilação, uma forma de modificação epigenética responsável pela regulação de diversas funções vegetais, entre elas o crescimento, via alterações na expressão gênica e na remodelação da cromatina, as respostas à estresses abióticos e a regulação metabólica (ELSEEHY; EL-SHEHAWI, 2018; HAN; WAGNER, 2014; YAISH et al., 2018). Uma vez que a planta percebe o estresse, os fatores de transcrição envolvidos nesta resposta induzem a expressão de uma cascata de eventos, que muitas vezes estão reguladas pelas modificações epigenéticas (BILICHACK et al., 2012; SONG et al., 2012).

O estresse causado pelo déficit hídrico é um dos responsáveis pelas mudanças epigenéticas no genoma, à nível de metilação, que se correlacionam com respostas no transcriptoma (ANNA CONDIA; MAGEROY; MARTINEZ, 2018; COLANERI; JONES, 2013; KAWAKATSU et al., 2016; O'MALLEY et al., 2016). A distribuição dessa metilação nos genomas vegetais é regulada pela ação de metiltransferases e desmetilases (ZHANG; LANG; ZHU, 2018) e envolve muitos genes diferentes (FIGURA 2.5). Há um interesse crescente nos estudos dessas enzimas e seus efeitos em características vegetais, pois esta é uma ferramenta potencial para seleção de genótipos tolerantes à vários tipos de estresses,

principalmente quando essas variações ocorrem entre indivíduos da mesma espécie, o que possibilita o uso desse conhecimento em programas de melhoramento (ANNACONDIA; MAGEROY; MARTINEZ, 2018; VICTORIA et al., 2018).

Pensando nisso e com a hipótese de que o processo de metilação está influenciando as respostas contrastantes dos clones VM01 e VM05, a expressão do gene *EgrMET1* também foi determinada em diferentes condições hídricas, via qPCR. Para esse gene, detectamos uma resposta diferencial principalmente nas plantas do clone VM05 que estavam há quatro dias sem água (T4). Neste tratamento, essas plantas aumentaram 12x a expressão da metiltransferase, em relação ao controle e ao clone VM01, nos demais tratamentos. Isso sugere que o clone VM05 está sob controle epigenético e que, possivelmente, essa metilação está influenciando alguma resposta ao déficit hídrico, uma vez que outras alterações fisiológicas e bioquímicas nesse clone também ocorreram nesse ponto.

O fato de ter havido variação na expressão do *EgrMET1* entre os dois clones pode ser o reflexo da ocorrência de diferentes regulações em seus homólogos ou de estratégias diferentes de sobrevivência utilizadas pelas espécies. Variedades de trigo tolerantes ao déficit hídrico também aumentaram a expressão do gene *MET1* em algum momento do estresse (ELSEEHY; EL-SHEHAWI, 2018). Como o clone VM05 apresentou evidências de ser mais sensível ao déficit hídrico, embora algumas plantas tenham sobrevivido aos seis dias sem água (T6), sua manutenção em condições estressantes pode derivar da metilação, padrão que foi mais acentuado nesse clone que no VM01. Resultados similares já foram obtidos para o clone VM05 em condições déficit hídrico (MARTINS et al., 2018). Entretanto, essa interação do controle epigenético com as respostas ao estresse ainda são incompreendidas e pouco exploradas (BARTELS et al., 2018). Novas oportunidade para estudo da metilação em eucalipto podem surgir dos estudos com os genes apresentados na Tabela 2.2.

As respostas vegetais ao déficit hídrico são muito similares àquelas do estresse salino. Análises de expressão gênica, via qPCR, em plantas de soja demonstraram que o estresse salino mudou o status de metilação de quatro fatores de transcrição relacionados a esse estresse, incluindo membros da família DREB, sugerindo que a metilação tem um papel crítico na ativação/repressão desse fator de transcrição e que esse padrão pode estar envolvido na tolerância das plantas ao estresse (SONG et al., 2012).

As análises do padrão de expressão relativa das famílias NCED, DREB e MET revelaram dezenas de genes possíveis de serem estudados em eucalipto, muitos dos quais estão envolvidos diretamente com as respostas ao déficit hídrico. As análises de qPCR, direcionadas para genes específicos, nesse caso *EgrNCED3*, *EgrDREB2* e *EgrMET1*, englobaram

características gerais e revelaram alterações durante o déficit hídrico e respostas diferentes entre os clones VM01 e VM05. Isso pode ser relacionado de alguma maneira com as respostas de tolerância e com os danos que as plantas sofreram nesse período. Novas análises com os dados do perfil de expressão poderão ser conduzidas à fim de elucidar melhor as diferenças entre os dois clones.

CONCLUSÃO

A comparação da expressão gênica relativa nas famílias NCED, DREB e MET demonstrou que existem vários genes com potencial de uso em estudos futuros com déficit hídrico em eucalipto.

O déficit hídrico provocou mudanças na expressão gênica dos dois clones avaliados, seja pelo aumento ou diminuição no nível de expressão de genes específicos (*EgrNCED3*, *EgrDREB2* e *EgrMET1*).

A análise das diferenças na expressão gênica, via qPCR, entre os clones VM01 e VM05 pode refletir a capacidade de tolerância ou de sobrevivência dessas plantas sob déficit hídrico. Elas indicam que os dois clones apresentam estratégias moleculares e tempos diferentes de resposta à escassez de água. Quando acompanhadas com observações morfológicas, essas análises indicam que o clone VM01 apresenta maior capacidade de sobrevivência em condições limitantes.

A análise da expressão gênica dos genes candidatos revelou regulação no nível transcricional do déficit hídrico, principalmente para o gene *EgrMET1*, envolvido com as respostas epigenéticas, as quais foram mais associados ao clone VM05. Entretanto, a natureza dinâmica da metilação nessa espécie está em estágios iniciais de estudos e compreensão.

Os dados obtidos nesse trabalho são estudos iniciais de genes associados à processos específicos em eucalipto. Experimentos futuros, com os dois clones contrastantes, podem vir a auxiliar na compreensão da tolerância ao déficit hídrico nessas espécies, em nível transcricional.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, P. K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 12, p. 1263-1274, 2006.
- ANNA CONDIA, M. L.; MAGEROY, M. H.; MARTINEZ, G. Stress response regulation by epigenetic mechanisms: changing of the guards. **Physiologia Plantarum**, v. 162, p. 239-250, 2018.

- ARIKAN, B.; OZDEN, S.; TURGUT-KARA, N. DNA methylation related gene expression and morphophysiological response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 149, p. 17-26, 2018.
- BARTELS, A. et al. Dynamic DNA Methylation in Plant Growth and Development. **International Journal of Molecular Science**, v. 19, n. 7, p. 1-17, 2018.
- BILICHAK A. et al. The progeny of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression. **PLOS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2012.
- BRAY, E. A. Abscisic acid regulation of gene expression during water deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 153-161, 2002.
- BRUNETTI, C. et al. Dynamic changes in ABA content in water-stressed *Populus nigra*: effects on carbon fixation and soluble carbohydrates. **Annals of Botany**, p. 1-17, 2019.
- CHANG, S. et al. Genetic engineering of trees: progress and new horizons. **In Vitro Cellular e Developmental. Biology – Plant**, v. 54, p.341-376, 2018.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolation RNA from Pines trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 2, p. 113-116, 1993.
- CHEN, M. et al. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and highsalt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, p. 299-305, 2007.
- COLANERI, A. C.; JONES, A. M. Genome-wide quantitative identification of DNA differentially methylated sites in *Arabidopsis* seedlings growing at different water potential. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-10, 2013.
- DASGUPTA, M. G.; DHARANISHARANTHI, V. Identification of PEG-induced water stress responsive transcripts using co-expression network in *Eucalyptus grandis*. **Gene**, v. 267, p. 393-407, 2017.
- DEJONGHE, W.; OKAMOTO, M.; CUTLER, S. R. Small Molecule Probes of ABA Biosynthesis and Signaling. **Plant and Cell Physiology**, v.59, n. 8, p. 1-10, 2018.
- ELSEEHY, M. M.; EL-SHEHAWI, A. M. Expression Profile of Wheat DNA Methyltransferases Genes in Egyptian Wheat (*Triticum aestivum*) Varieties Under PEG Induced Dehydration. **Alexandria Science Exchange Journal**, v. 39, n. 4, p. 695-701, 2018.
- ENDO, A. et al. Drought induction of *Arabidopsis* 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. **Plant Physiology**, v. 147, p.1984-1993, 2008.
- ESTRADA-MELO, A. C. et al. Overexpression of an ABA biosynthesis gene using a stress-inducible promoter enhances drought resistance in petunia. **Horticulture Research**, v. 2, n. 15013, p. 1-9, 2015.
- FAN, C. et al. Characterization of *Brassinazole resistant (BZR)* gene family and stress induced expression in *Eucalyptus grandis*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 5, p. 821-831, 2018.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 673-689, 2015.

FINKELSTEIN, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. **The Arabidopsis Book**, v. 11, p.1-52, 2013.

FUJITA, Y. et al. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, p. 509-525, 2011.

HAN, S.; WAGNER, D. Role of chromatin in water stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 10, p. 2785-2799, 2014.

HODECKER, B. E. R. et al. Water availability preceding long-term drought defines the tolerance of *Eucalyptus* to water restriction. **New Forests**, v. 49, p. 173-195, 2018.

IBÁ (Indústria Brasileira de Árvores), 2019. **Cenários IBÁ: estatísticas da Indústria Brasileira de Árvores**. 7 p. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/e-mail-marketing/cenarios/cena-rios-57-1otrim-2019-iba.pdf>>. Acesso em: 27 maio 2019.

JAIN, D. et al. The ‘Omics’ Approach for Crop Improvement Against Drought Stress. In: RAJPAL V., SEHGAL D., KUMAR A., RAINA S. (Eds). **Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches**. Cham: Springer, p. 183-214. 1 ed, 2019.

JOVANOVIC, Z. et al. The expression of drought responsive element binding protein (*DREB2A*) related gene from pea (*Pisum sativum* L.) as affected by water stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 10, p. 1590-1596, 2013.

KALLADAN, R. et al. Natural Variation in 9-*Cis*-Epoxyxanthoxin Dioxygenase 3 and ABA Accumulation. **Plant Physiology**, v. 179, p. 1620-1631, 2019.

KAWAKATSU T. et al. Epigenomic diversity in a global collection of *Arabidopsis thaliana* accessions. **Cell**, v. 166, p. 492-505, 2016.

KHAN, M. S. The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 25, p. 2433-2442, 2011.

KIM, J.-M. et al. Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 114, 2015.

KIM, J.-M. et al. Transition of chromatin status during the process of recovery from drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**, v. 53, n. 5, p. 847-856, 2012.

LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 1, p. 83-108, 2012.

LI, D. et al. Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* under salt stress identified a novel CBF transcription factor MtCBF4 that plays an important role in abiotic stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 109, p. 1-19, 2011.

LI, H. et al. Genome-Wide Identification of AP2/ERF Transcription Factors in Cauliflower and Expression Profiling of the ERF Family under Salt and Drought Stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 946, p. 1-14, 2017.

- LIM, C. W. et al. Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 15251-15270, 2015.
- LIU, J. et al. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in *Panax ginseng* at Different Stages of Growth and in Different Organs. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1-14, 2014.
- LI, S. et al. Effects of drought and salt-stresses on gene expression in *Caragana korshinskii* seedlings revealed by RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 17, n. 200, p. 1-19, 2016.
- LONG, H. et al. An abscisic acid (ABA) homeostasis regulated by its production, catabolism and transport in peanut leaves in response to drought stress. **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p. 1-24, 2019.
- MARINHO, J. P. et al. Metabolic alterations in conventional and genetically modified soybean plants with GmDREB2A;2 FL and GmDREB2A;2 CA transcription factors during water deficit. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 140, p. 122-135, 2019.
- MARTINS, G. S. et al. Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 229, p. 122-131, 2018.
- MIZOI, J. et al. GmDREB2A;2, a Canonical DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN2-Type Transcription Factor in Soybean, Is Posttranslationally Regulated and Mediates Dehydration-Responsive Element-Dependent Gene Expression. **Plant Physiology**, v. 161, p. 346-361, 2013.
- MYBURG, A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, p. 356-374, 2014.
- NGARA, R. et al. Identifying differentially expressed proteins in sorghum cell cultures exposed to osmotic stress. **Scientific Reports**, v. 8, n. 8671, p. 1-12, 2018.
- NGUYEN, H. C. et al. Special trends in CBF and DREB2 groups in *Eucalyptus gunnii* vs *Eucalyptus grandis* suggest that CBF are master players in the trade-off between growth and stress resistance. **Physiologia Plantarum**, v. 159, p. 445-467, 2017.
- OH, S.-J. et al. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in Transgenic Rice Increased Tolerance to Abiotic Stress without Stunting Growth. **Plant Physiology**, v. 138, p. 341-351, 2015.
- OLLAS, C. de.; DODD, I. C. Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. **Plant Molecular Biology**, v. 91, p. 641-650, 2016.
- O'MALLEY, R. C. et al. Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1280-1292, 2016.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2003-2007, 2001.
- PRUTHVI, V.; NARASIMHAN, R.; NATARAJA, K. N. Simultaneous Expression of Abiotic Stress Responsive Transcription Factors, *AtDREB2A*, *AtHB7* and *AtABF3* Improves Salinity

and Drought Tolerance in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). **PLOS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-21, 2014.

QIN, X.; ZEEVAART, J. A. D. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. **Plant Physiology**, v. 128, p. 544-551, 2002.

SAH, S. R.; REDDY, K. R. LI, J. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 571, p. 1-26, 2016.

SEILER, C. et al. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 8, p. 2615-2632, 2011.

SILVA, I. M. de A. et al. Determination of parameters for selection of *Eucalyptus* clones tolerant to drought. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 40, p. 3940-3949, 2016.

SIMURA, J. et al. Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. **Plant Physiology**, v. 177, p. 476-489, 2018.

SONG, Y. et al. The Dynamic Changes of DNA Methylation and Histone Modifications of Salt Responsive Transcription Factor Genes in Soybean. **PLOS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1-11, 2012.

SOUZA, A. M. S. de. et al. Expression of NCED gene in colored cotton genotypes subjected to water stress. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 8, p. 692-696, 2016.

TAIZ, L. et al. (Eds.); [MASTROBERTI, A. A. et al. (trad.)] **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed., 2017, 888 p.

THIOUNE, E. H. et al. A humidity shock leads to rapid, temperature dependent changes in coffee leaf physiology and gene expression. **Tree Physiology**, v. 37, p. 367-379, 2017.

TORRES, L. F. et al. Expression of DREB-Like Genes in *Coffea canephora* and *C. arabica* Subjected to Various Types of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 98-116, 2019.

VICTORIA, D. et al. Spatial and temporal expression of cytosine-5 DNA methyltransferase and DNA demethylase gene families of the *Ricinus communis* during seed development and drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 84, p. 81-94, 2018.

VINING, K. J. et al. The floral transcriptome of *Eucalyptus grandis*. **New Phytologist**, v. 206, p. 1406-1422, 2015.

VINSON, C. C. et al. Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1-28, 2018.

XIONG, L.; ZHU, J.-K. Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 133, p. 29-36, 2003.

WANG, Z.; GERSTEIN, M; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WANI, S. H. et al. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **The Crop Journal**, v. 4, p. 162-176, 2016.

WOO, D. H. et al. *Arabidopsis lenc1* mutant displays reduced ABA accumulation by low *AtNCED3* expression under osmotic stress. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.140-147, 2011.

YAISH, M. W. et al. Genome-wide DNA Methylation analysis in response to salinity in the model plant caliph medic (*Medicago truncatula*). **BMC Genomics**, v. 19, n. 78, p. 1-17, 2018.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. **Plant Cell**, v. 6, p. 251-264, 1994.

YOSHIDA, T.; MOGAMI, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 21, p. 133-139, 2014.

YU, W. et al. ABA signaling rather than ABA metabolism is involved in trehalose-induced drought tolerance in tomato plants. **Planta**, v. 250, p. 643-655, 2019.

ZANDKARIMI H. et al. Analyzing the expression profile of AREB/ABF and DREB/CBF genes under drought and salinity stresses in grape (*Vitis vinifera* L.). **PLOS ONE**, v. 10, p. 1-16, 2015.

ZHANG, H.; LANG, Z.; ZHU, J.-K. Dynamics and function of DNA methylation in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, p. 489-506, 2018.

ZHANG, J. et al. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. **Field Crops Research**, v. 97, p. 111-119, 2006.

ZHANG, Y. et al. Overexpressing *SgNCED1* in Tobacco Increases ABA Level, Antioxidant Enzyme Activities, and Stress Tolerance. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 27, p. 151-158, 2008.

ZHU, J.-K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

ARTIGO 3: Distribuição de metabólitos em tecidos foliares de eucalipto submetido ao déficit hídrico.

ARTIGO 3: Distribuição de metabólitos em tecidos foliares de eucalipto submetido ao déficit hídrico.

RESUMO

Projeções climáticas predizem maiores variações na precipitação nos próximos anos, com eventos de escassez hídrica cada vez mais frequentes. Entre os processos fisiológicos de resposta à essa escassez, o acúmulo de carboidratos é tido como chave para a manutenção dos processos celulares vegetais. Isso porque alguns açúcares podem atuar como osmólitos que desempenham um papel significativo no ajuste osmótico sob condições de déficit hídrico. Além deste ajuste, uma resposta ainda mais rápida ao estresse é desencadeada pelo ácido abscísico (ABA), fitormônio que está diretamente relacionado ao fechamento estomático e, conseqüentemente, às reduções na perda de água. Tais respostas variam com a severidade do estresse e com o material genético, por isso, este trabalho teve como objetivo avaliar como a dinâmica de carboidratos e de ABA é distribuída em diferentes materiais genéticos de eucalipto sob déficit hídrico. Para isso, foi feita a quantificação desses compostos em folhas dos clones VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis*) e VM05 (*E. urophylla*). As quantificações de carboidratos revelaram que o clone VM01 variou muito mais as concentrações deste compostos que o clone VM05, sendo que a principal diferença entre eles ocorreu entre o terceiro e o quarto dia de déficit hídrico. Os níveis endógenos de ABA, associados com dados de condutância estomática, indicaram que o clone VM01 fechou os estômatos primeiro que o clone VM05. A análise dos dados revelou uma maior tolerância do clone VM01 ao déficit hídrico e ajudou a compreender como os diferentes mecanismos de resposta ao déficit hídrico podem ser utilizados pelas plantas.

Palavras-chave: Carboidratos. Ácido abscísico. Estresse abiótico.

ABSTRACT

Climate projections predict greater variations in rainfall over the next few years, with increasingly frequent water scarcity events. Among the physiological processes in response to this shortage, carbohydrate accumulation is considered key to the maintenance of plant cellular processes. This is because some sugars may act as osmolytes that play a significant role in osmotic adjustment under water deficit conditions. In addition to this adjustment, an even faster response to stress is triggered by abscisic acid (ABA), phytohormonium, which is directly related to stomatal closure and, consequently, reductions in water loss. Such responses vary with stress severity and genetic material, so this study aimed to evaluate how carbohydrate and ABA dynamics are distributed in different eucalyptus genetic materials under water deficit. For this, the quantification of these compounds was done in leaves of clones VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis*) and VM05 (*E. urophylla*). Carbohydrate quantifications revealed that clone VM01 varied the concentrations of these compounds much more than clone VM05, and the main difference between them occurred between the third and fourth day of water deficit. Endogenous ABA levels associated with stomatal conductance data indicated that clone VM01 closed the stomata first than clone VM05. Data analysis revealed a greater tolerance of clone VM01 to water deficit and helped to understand how different water stress response mechanisms can be used by plants.

Keywords: Carbohydrates. Abscisic acid. Abiotic stress.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos florestais no Brasil e no mundo leva à expansão das florestas plantadas para áreas onde as restrições hídricas são mais severas, aumentando a probabilidade de danos ou mortalidade pela seca (HODECKER et al., 2018). Além disso, estimativas apontam que os sistemas de produção e os ecossistemas terrestres estão cada vez mais susceptíveis a eventos climáticos extremos, como aumento da temperatura média global e escassez de água (OECD, 2019). Entre esses eventos, a redução da disponibilidade de água é o fator mais agravante para as culturas, pois afeta diretamente vários processos celulares e resulta na baixa eficiência de processos metabólicos (ZARGAR et al., 2017). Em situações de seca ou déficit hídrico severo ocorre redução na assimilação de carbono pelas plantas (INGRISCH et al., 2018; KARLOWSKY et al., 2018; ROY et al., 2016) e, conseqüentemente, da concentração de carboidratos acumulados, principalmente em tecidos foliares (BURRI et al., 2014).

Para mitigar os efeitos desse estresse é comum que as plantas mobilizem amido, sacarose e metabólitos derivados para liberar energia e garantir que o metabolismo continue em condições de baixa disponibilidade hídrica (THALMANN; SANTELIA, 2017). A distribuição desses carboidratos ocorre para manutenção do equilíbrio osmótico nas células, e conseqüentemente, sua sobrevivência em condições adversas (HASIDEBER et al., 2015). Os solutos osmorreguladores podem ser armazenados tanto na forma de polissacarídeos, com baixa atividade osmótica, como o amido, quanto na forma de açúcares altamente solúveis, como a sacarose e as hexoses (BURRI et al., 2014).

O amido, para ser sintetizado, depende dos produtos gerados pela fotossíntese, processo fortemente afetado pelo ambiente. Ele é armazenado no cloroplasto na forma de grânulos insolúveis e por ser osmoticamente inerte, atua como reserva de carbono reduzido, utilizada para a manutenção dos processos respiratórios durante à noite (ZANELLA et al., 2016). A síntese desse composto é geralmente reprimida sob déficit hídrico, mas há indícios de que nos estágios iniciais do estresse pode ocorrer um aumento transitório em sua concentração (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Em resposta ao déficit hídrico mais severo, o amido é degradado, garantindo uma melhor tolerância ao estresse em algumas culturas (PRASH et al., 2015; THALMANN; SANTELIA, 2017).

Com a degradação do amido, hexoses fosfato são liberadas no citosol e, em condições normais, são utilizadas para a síntese de sacarose. Sob déficit hídrico, esses compostos podem se acumular no citosol para manter o turgor celular e estabilizar proteínas e estruturas celulares (THALMANN et al., 2016). Entre os açúcares liberados, a glicose, constituinte do amido, é um

dos compostos principais. Ela é um açúcar capaz de sofrer oxidação na presença de antioxidantes, por isso é chamada de açúcar redutor (SANTOS et al., 2017). A concentração desses açúcares solúveis varia muito nas folhas entre as espécies sob déficit hídrico, podendo permanecer constante ou aumentar sob estresse intenso. A inibição do crescimento e exportação desses carboidratos, na forma de sacarose, explica porque, sob baixa absorção de carbono, os açúcares podem aumentar nas lâminas foliares. Isso porque o déficit hídrico também diminui o potencial hídrico da planta e o turgor necessário para a expansão celular, o que reduz a demanda de carbono para o crescimento (HARTMANN; TRUMBORE, 2016). Alterações na magnitude dos reservatórios de açúcar são apoiadas por mudanças nas atividades enzimáticas envolvidas nas vias de sacarose e amido, como α -amilase, sacarose sintase e invertase, sendo sua associação com déficit hídrico e fotossíntese destacada em diversos estudos (EOM et al., 2015; HASIDEBER et al., 2015; INGRISCH et al., 2018; PINHEIRO; CHAVES, 2011; SALES et al., 2012; THALMANN et al., 2016).

O último carboidrato sintetizado é a sacarose, processo que ocorre no citosol das células foliares e está acoplado ao carregamento do floema, onde assegura o fornecimento de carboidratos para as demais partes da planta (TAIZ et al., 2017). Por isso, a sacarose é tida como o soluto que cria a força motriz para a translocação de todos os outros solutos no floema (EOM et al., 2015). Entretanto, os mecanismos ligados ao acúmulo desse açúcar difere entre as espécies, até mesmo entre cultivares; para entender o impacto dos estresses abióticos nesse acúmulo são necessários estudos específicos.

De modo geral, o armazenamento de carboidratos e sua dinâmica de distribuição desempenham um papel fundamental na maioria dos processos vegetais, pois afetam a dinâmica na planta inteira (PINHEIRO; CHAVES, 2011). No entanto, em espécies lenhosas a compreensão dessa distribuição é limitada, porém de extrema importância, uma vez que essas plantas passam por muitos períodos de estresse ao longo da vida.

Além dos compostos já citados, o déficit hídrico influencia também o acúmulo de outras substâncias, como aminoácidos, proteínas, espécies reativas de oxigênio e alguns hormônios envolvidos na resposta ao estresse, sendo o ácido abscísico (ABA) o principal fitormônio que atua em baixas condições hídricas (FINKELSTEIN et al., 2013; LAXA et al., 2019; RAMAKRISHINA; GILL, 2018; ZANELLA et al., 2016).

O ABA apresenta múltiplos papéis sob déficit hídrico, entre eles o fechamento estomático, a regulação da síntese de proteínas LEA e de osmorreguladores e a regulação de genes responsivos ao estresse (VALDÉS et al., 2013; WANI et al., 2016). As variações nos níveis desse hormônio ocorrem através de uma complexa rede de transdução de sinais, formada

por codificadores de várias famílias de genes, capazes de gerarem respostas que alteram o padrão fisiológico (DEJONGHE; OKAMOTO; CUTLER, 2018).

Em ambientes com baixa disponibilidade de água, o ABA é redistribuído nas folhas ou tem sua biossíntese estimulada, a fim de provocar o fechamento estomático. Seu acúmulo em folhas estressadas exerce um importante papel na redução da perda de água pela transpiração, por isso é considerado uma das respostas mais rápidas detectadas em plantas sob déficit hídrico (KALLADAN et al., 2019; NOLAN et al., 2017). Quando a umidade aumenta ou a água volta a estar disponível, os níveis de ABA diminuem e permitem a reabertura estomática (ZHU, 2016). O nível de resposta dos tecidos ao ABA é determinado pela sensibilidade do material vegetal a este fitormônio (DASZKOWSKA-GOLEC; SZAREJKO, 2013).

Para testar a hipótese de que a dinâmica desses compostos, envolvidos nas respostas ao déficit hídrico, são afetados diferencialmente em materiais genéticos contrastantes de eucalipto, foi feita a quantificação de carboidratos e de ABA em folhas dos clones VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *E. camaldulensis*) e VM05 (*E. urophylla*), submetidos à diferentes regimes hídricos. Os objetivos foram avaliar o padrão de distribuição de moléculas sinalizadoras do déficit hídrico em plantas de eucalipto e se estas plantas alteram tais compostos de maneiras diferentes, de modo a contribuir para a tolerância ao déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Estabelecimento do déficit hídrico

O material vegetal utilizado para as análises foi coletado segundo descrição no item “Material e Métodos” do Artigo 1. A nomenclatura dos tratamentos também manteve-se a mesma descrita anteriormente.

Extração de macromoléculas

Para a extração de macromoléculas, foi utilizada a massa seca do segundo par de folhas completamente expandidas, obtida após a secagem das mesmas à 65°C, quando atingiram peso constante. Para isso, 200 mg de massa seca foram maceradas em 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), seguido por banho-maria à 40°C por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas à 3.000 g por 10 minutos e o sobrenadante (extrato bruto) foi coletado. Alíquotas do extrato obtido foram utilizadas para extração de sacarose e açúcares redutores. O resíduo dessa extração foi utilizado para a extração de amido.

Extração e quantificação de amido

Para extração do amido, o resíduo obtido da extração de macromoléculas foi ressuspensionado em 4,0 mL de tampão acetato de potássio 200 mM (pH 4,8) e 1,0 mL de solução de amiloglicosidase (1mg/mL). Após incubação das amostras em banho-maria à 40°C por duas horas, as mesmas foram centrifugadas à 3.000 g por 10 minutos e tiveram o sobrenadante coletado. Após a quantificação pelo método da Antrona (YEMM; WILLIS, 1954), as concentrações, em μmol de glicose/g de matéria seca, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração, utilizando as medidas de absorbância obtidas diretamente em planilhas do Microsoft® Excel.

Quantificação de açúcares redutores

A quantificação de açúcares redutores foi feita pelo método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). As concentrações, em μmol de glicose/g de matéria seca, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração, utilizando as medidas de absorbância obtidas diretamente em planilhas do Microsoft® Excel.

Extração e quantificação de sacarose

Para extração de sacarose, foi utilizado o método proposto por Handel (1968) adaptado. Em microtubos de 2,0 mL, 800 μL do extrato de macromoléculas foram homogeneizados em 800 μL de KOH 30% e incubados em banho-maria por 15 minutos, à 37°C. A quantificação foi feita pelo Método da Antrona (YEMM; WILLIS, 1954) e as concentrações, em μmol de glicose/g de matéria seca, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração, utilizando as medidas de absorbância obtidas diretamente em planilhas do Microsoft® Excel.

Extração, purificação e quantificação de ABA

Para quantificação relativa do ABA, as amostras de todos os tratamentos foram submetidas à extração segundo adaptação da metodologia proposta por Durgbanshi et al. (2005). A preparação das amostras foi via maceração do tecido foliar em nitrogênio líquido seguida por secagem em liofilizador por 24 horas.

Para a extração, 30 mg de tecido foliar seco foram homogeneizados em 1,0 mL de metanol 80% v/v e centrifugados à 5.000 g por 10 minutos em temperatura ambiente. O

sobrenadante foi coletado e mantido em capela de exaustão para evaporação do metanol, até restarem apenas 150 µL do extrato. Para a purificação, o pH foi corrigido com ácido acético 10% v/v até 3,0 e o volume foi completado com água milli-Q até 500 µL. A separação das fases foi realizada duas vezes, com a adição de 500 µL de éter dietílico em cada separação e recuperação da fase orgânica. Por fim, a fase aquosa foi eliminada em concentrador à vácuo.

Para quantificação, a fase orgânica restante da etapa de purificação foi ressuspensa em 500 µL de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila e centrifugada por 30 minutos à 14.000 g, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e seguiu para injeção em espectrômetro de massas.

O aparelho utilizado para a quantificação foi o *UPLC Shimadzu* acoplado a um MS/MS (*Bruker Corporation*[®]). As condições utilizadas para separação das fases foram:

- Fase móvel: A = água milli-Q + 0,1% de ácido fórmico; B = acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico.
- Temperatura: 50 °C.
- Coluna: C₁₈.
- Volume de injeção: 70 µL.
- Tempo de corrida: 25 minutos.
- Pressão do nebulizador: 4 bar.
- Fluxo do gás de secagem: 9 L/min.
- Temperatura do gás de secagem: 200 °C.
- *Spectro Rate*: 1 Hz.

Análises estatísticas

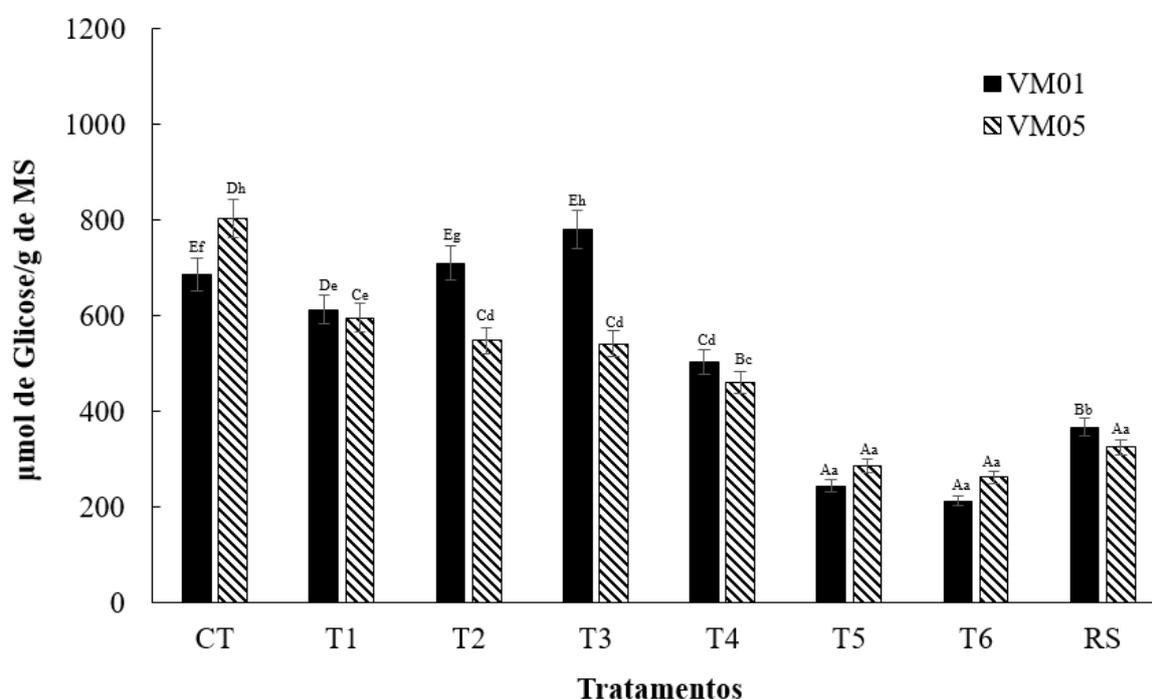
O delineamento do experimento foi montado em blocos casualizados, com esquema fatorial 2x8, sendo dois genótipos avaliados e oito tratamentos. Para a análise estatística, os tratamentos foram submetidos ao teste de Scott-Knott, com valor nominal de 5% de significância, no *software* SISVAR[®] versão 5.6.

RESULTADOS

Quantificação de amido

Para análise da distribuição de amido nas folhas, a quantificação foi feita em amostras de todos os tratamentos. O objetivo foi verificar as oscilações na concentração de carboidratos com a progressão do estresse, em comparação com os tratamentos irrigados. Os resultados da quantificação estão apresentados no Gráfico 3.1.

Gráfico 3.1 – Comparação da quantidade de amido nas folhas dos clones VM01 e VM05, sob diferentes regimes hídricos.



Legenda: CT (controle) = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS (resiliência) = 6 dias de estresse + 2 dias de irrigação. Valores expressos em μmol de Glicose por grama de matéria seca do tecido foliar. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os clones, segundo teste de Scott-Knott (5%).

É possível observar que o clone VM01 apresentou elevada quantidade de amido foliar nos três primeiros dias de estresse (T1-T3), com valores similares às plantas que não passaram pelo estresse (CT), com leve aumento do tratamento T1 até o T3. Em contrapartida, a partir do 4º dia de estresse (T4), ocorreu redução acentuada na quantidade desse amido, o que continuou à medida que a falta de água se manteve. Após o fim do estresse imposto e da reidratação das plantas do tratamento RS a quantidade de amido voltou a subir.

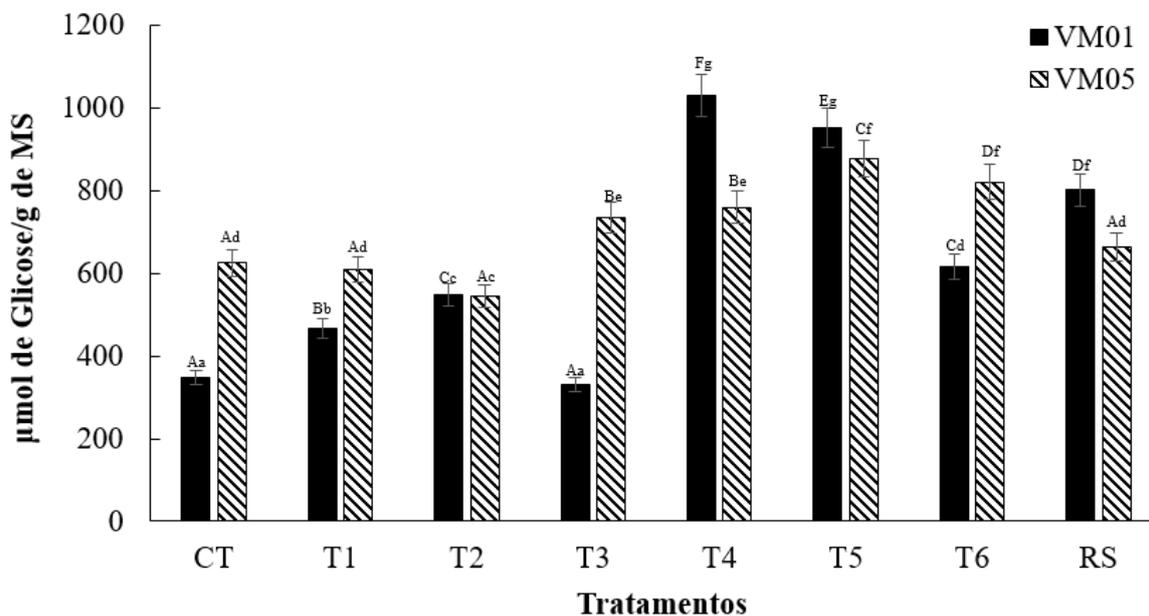
Para o clone VM05, o padrão de distribuição do amido entre os tratamentos foi similar ao VM01. Com o primeiro dia de déficit hídrico (T1) já é possível observar redução na quantidade de amido foliar em plantas do clone VM05, entretanto essa quantidade não sofreu alterações até o terceiro dia de estresse (T3) e sofreu uma pequena redução com o passar de mais um dia sem água (T4). Já as plantas que ficaram 5 e 6 dias sob déficit hídrico (T5 e T6, respectivamente) reduziram a quantidade de amido acumulado em mais da metade, quando comparadas com as plantas que não sofreram nenhum dia de estresse (CT). Os valores também mostram que o período de reidratação ao qual às plantas do tratamento RS foram submetidas não foi suficiente para que elas voltassem a acumular amido nas folhas na mesma quantidade que antes de sofrerem o estresse, uma vez que as quantidades são similares aos valores encontrados em plantas que passaram por um estresse mais severo.

É possível também comparar as variações na quantidade de amido entre os dois clones. Plantas sempre irrigadas dos dois clones (CT) apresentaram variações no conteúdo inicial de amido, sendo que o clone VM05 manteve uma maior quantidade de amido nas folhas que o clone VM01. Ao primeiro dia de estresse (T1), o clone VM05 reduziu o conteúdo de amido de maneira mais drástica que o clone VM01, padrão que se repetiu por mais dois dias de estresse (T2 e T3). Por outro lado, o clone VM01 apresentou comportamento inverso nesses dias, aumentando o conteúdo de amido do primeiro (T1) ao terceiro dia (T3) de déficit hídrico. No quarto dia de estresse (T4), ambos os clones sofreram nova redução na quantidade de amido, em valores similares. No quinto (T5) e sexto (T6) dia sem água, os teores de amido continuaram a cair nos dois clones, entretanto, o clone VM05 manteve quantidades um pouco maiores de amido. Quanto ao tratamento RS, o clone VM01 conseguiu acumular mais amido que o VM05, que manteve seus níveis próximos às plantas que estavam a seis dias sem água (T6).

Quantificação de açúcares redutores

A quantificação de açúcares redutores revelou um padrão de distribuição heterogêneo entre os tratamentos para o clone VM01 e com poucas variações no clone VM05 (GRÁFICO 3.2).

Gráfico 3.2 – Comparação da quantidade de açúcares redutores nas folhas dos clones VM01 e VM05, sob diferentes regimes hídricos.



Legenda: CT (controle) = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS (resiliência) = 6 dias de estresse + 2 dias de irrigação. Valores expressos em µmol de Glicose por grama de matéria seca do tecido foliar. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os clones, segundo teste de Scott-Knott (5%).

Plantas do clone VM01 aumentaram a quantidade de açúcares redutores nas folhas até o 2º dia de déficit hídrico (T2), reduziram no 3º dia (T3) e voltaram a aumentar no 4º (T4) e 5º dia (T5), mas em valores muito maiores que os observados anteriormente. No 6º dia de déficit (T6) os valores reduziram à níveis próximos aos do início do estresse e, após a reidratação (RS), subiram novamente, mantendo-se maiores desde o 1º dia de estresse. Este padrão, entretanto, não foi o mesmo observado para o clone VM05.

A quantidade de açúcares redutores em plantas do clone VM05 manteve-se a mesma ao comparar plantas irrigadas (CT), plantas que sofreram um (T1) ou dois dias de estresse (T2) e plantas que foram reidratadas após o estresse (RS). A partir do 3º dia sem água (T3) houve um pequeno aumento dessa quantidade, que continuou à medida que se passaram mais dias de déficit hídrico.

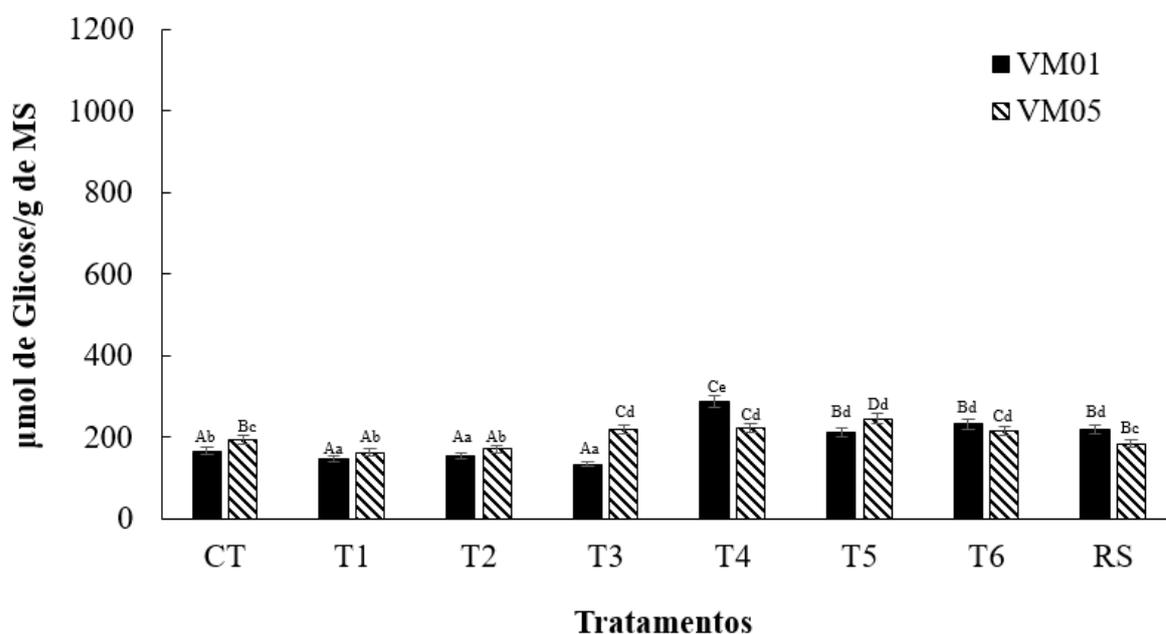
Ao analisar a distribuição de açúcares redutores nos dois clones, é possível perceber que o clone VM01 variou mais a quantidade destes compostos entre os tratamentos que o clone VM05 e que a diferença foi maior no controle (CT) e aos três dias (T3), quatro dias (T4) e 6 dias (T6) de déficit hídrico. Aos seis dias de estresse, observa-se que a quantidade de açúcares redutores diminuiu no clone VM01 e manteve-se a mesma no clone VM05; já nas plantas

reidratadas (RS), observa-se que a quantidade de açúcares aumentou em plantas do VM01 e diminuiu em plantas VM05.

Quantificação de sacarose

A quantidade de sacarose nos tecidos foliares dos dois clones de eucalipto foi determinada para todos os tratamentos. No Gráfico 3.3 estão representados os resultados dessa quantificação para plantas dos clones VM01 e VM05.

Gráfico 3.3 – Comparação da quantidade de sacarose nas folhas dos clones VM01 e VM05, sob diferentes regimes hídricos.



Legenda: CT (controle) = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS (resiliência) = 6 dias de estresse + 2 dias de irrigação. Valores expressos em µmol de Glicose por grama de matéria seca do tecido foliar. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os clones, segundo teste de Scott-Knott (5%).

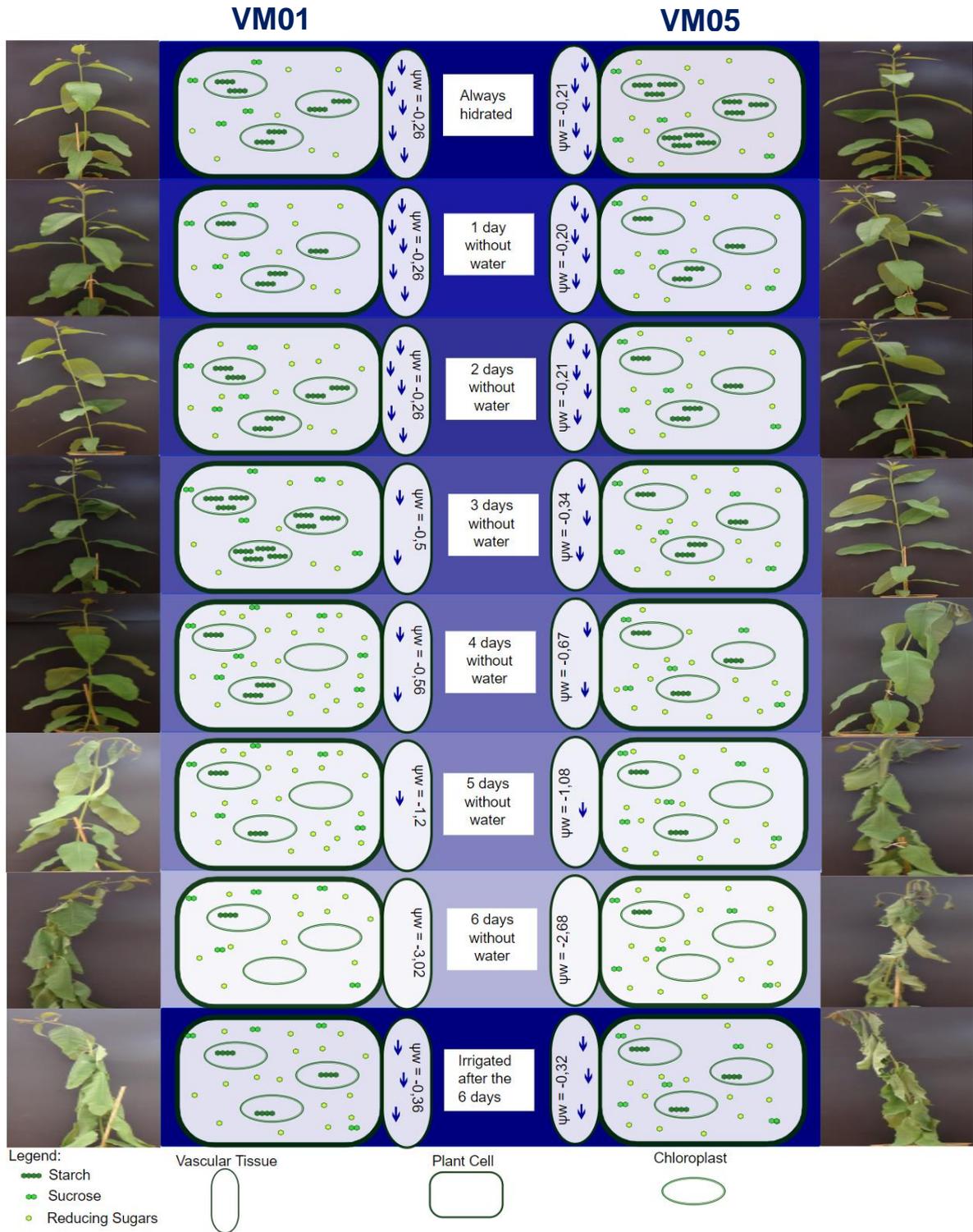
Nas plantas do clone VM01, a quantidade de sacarose se manteve com poucas variações em todos os tratamentos. Em plantas sempre irrigadas (CT) e em plantas que passaram por um (T1), dois (T2) ou três (T3) dias de déficit hídrico essa quantidade se manteve a mesma. Ao quarto dia sem água (T4) essa quantidade aumentou em aproximadamente 50% e caiu levemente nos dias que se seguiram sem água (T5 e T6). O reestabelecimento da irrigação para plantas do tratamento RS não alterou a quantidade deste açúcar nessas plantas, quando comparadas com plantas que estavam a 5 e 6 dias sem água (T5 e T6, respectivamente).

Em plantas do clone VM05, as alterações na quantidade de sacarose também não foram muito expressivas. Nos dois primeiros dias sem água (T1 e T2) houve uma pequena redução na quantidade de sacarose presente nas folhas, seguida por um leve aumento dessa quantidade à medida que as plantas ficavam mais dias sem água. Plantas reidratadas após 6 dias de estresse (RS) apresentaram um conteúdo de sacarose menor que as plantas que não foram reidratadas, em valores similares àqueles encontrados em plantas que não passaram por nenhum dia de estresse (CT).

Ao comparar os clones VM01 e VM05 quanto à quantidade de sacarose nas folhas, observa-se que a principal diferença entre eles está nos tratamentos que representam o meio do período de déficit hídrico (T3 e T4) e no tratamento RS. Enquanto o clone VM01 aumentou o conteúdo de sacarose nas plantas do tratamento T4 (4 dias de déficit hídrico), o clone VM05 manteve esses valores constantes. Já para o tratamento RS, que passou por reidratação, as plantas no clone VM01 aumentaram a quantidade de sacarose em valores superiores aos das plantas sempre irrigadas (CT); para o clone VM05, esse padrão foi invertido.

Todas as quantificações foram resumidas em um modelo da distribuição de carboidratos para os clones VM01 e VM05, feito com base nos resultados obtidos (FIGURA 3.1). A figura também traz dados da média do potencial hídrico (MPa) das plantas de cada tratamento (GRÁFICO 1.1 – Artigo 1).

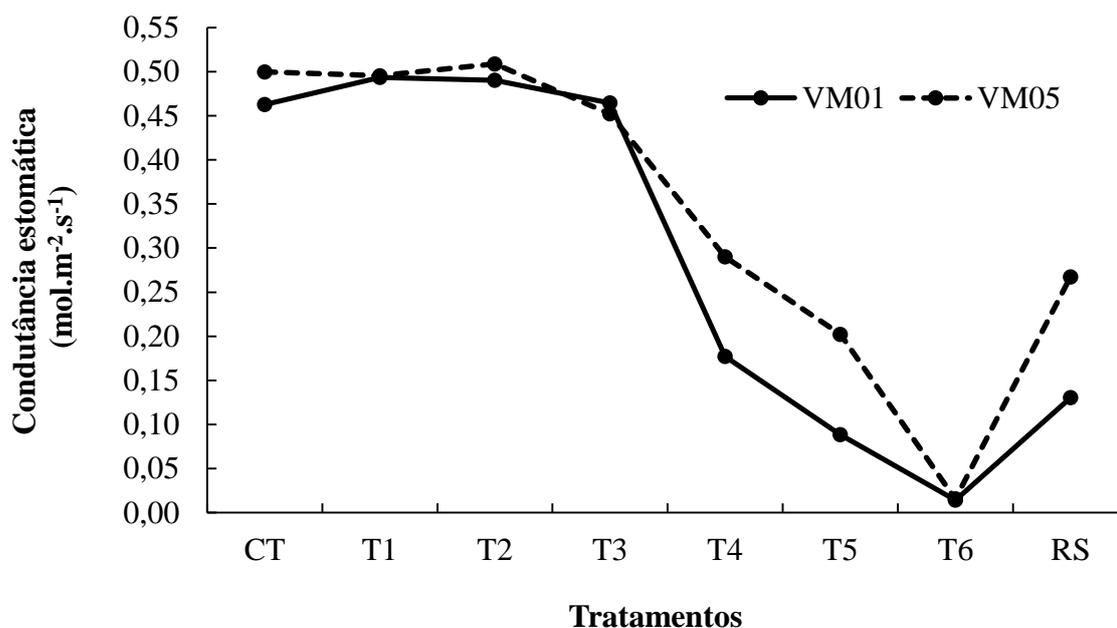
Figura 3.1 – Esquema representando a dinâmica de carboidratos nas células do tecido foliar dos clones VM01 e VM05 em cada fase do estresse.



Condutância estomática

A condutância estomática nas plantas dos dois clones também foi avaliada em cada tratamento (GRÁFICO 3.4).

Gráfico 3.4 – Condutância estomática de plantas dos clones VM01 e VM05 submetidos à diferentes regimes hídricos.



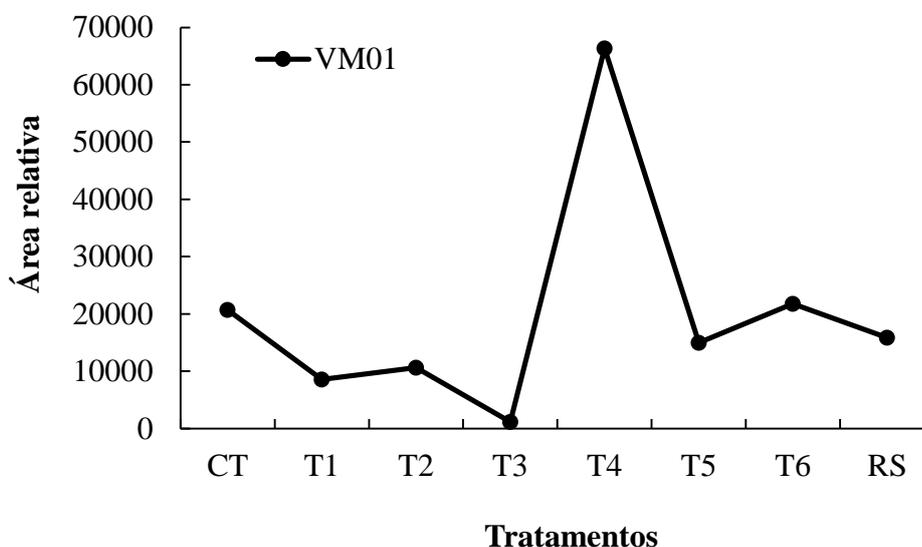
Legenda: CT = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

À medida que o déficit hídrico avança, os valores da condutância estomática diminuem. Observando o gráfico é possível perceber que o clone VM05 mantém os estômatos mais abertos em situações de boa disponibilidade de água, em comparação com o clone VM01. Quando o déficit hídrico começa a ficar mais severo, entre três e quatro dias sem água (T3 e T4), ambos os clones começam a fechar os estômatos, porém o clone VM01 faz isso de maneira muito mais acentuada; apenas no sexto dia sem água (T6) os valores da condutância estomática tornam-se similares entre os dois clones. Após a reidratação (RS) é possível perceber que as plantas do clone VM05 abrem os estômatos rapidamente, onde os valores da condutância são o dobro daqueles medidos no clone VM01, para as mesmas condições.

Quantificação de ácido abscísico

Para determinar as modulações nos níveis endógenos de ABA nos clones VM01 e VM05 durante os dias de déficit hídrico, foram utilizados tecidos foliares de todos os tratamentos. Os resultados dessa quantificação estão plotados no Gráfico 3.5, para plantas do clone VM01.

Gráfico 3.5 – Níveis endógenos de ABA em tecidos foliares do clone VM01 sob diferentes regimes hídricos.

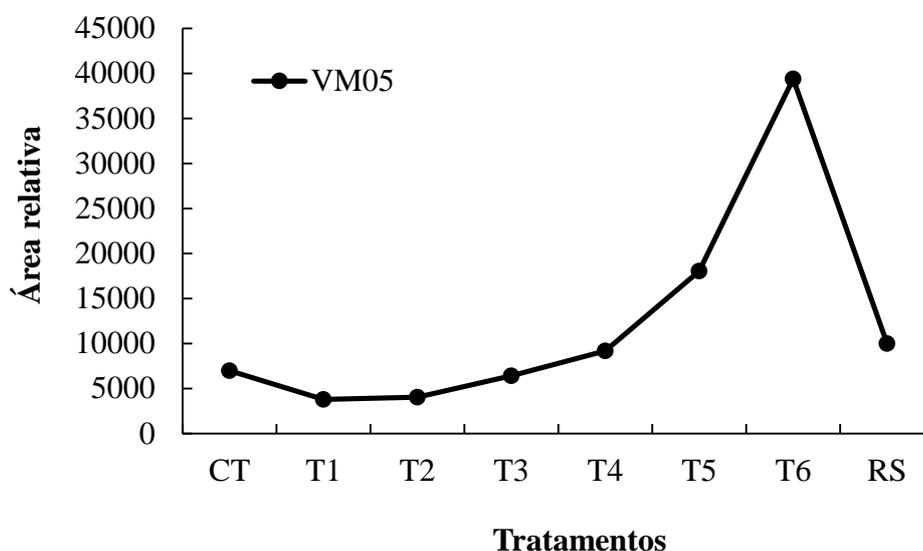


Legenda: CT = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

Nas plantas VM01, ao primeiro dia sem água (T1), o conteúdo de ABA reduziu 50%, em comparação com plantas sempre irrigadas (CT). Esses valores mantiveram-se similares em T2 e chegaram à níveis muito baixos em T3. O grande aumento detectado no nível endógeno desse fitormônio ocorreu ao quarto dia de déficit hídrico (T4), quando o conteúdo de ABA aumentou 7x em relação ao dia anterior (T3). A partir desse ponto, houve nova redução no conteúdo, padrão que se manteve nos demais tratamentos.

Já nas plantas do clone VM05, as variações de ABA endógeno foram menos pronunciadas, pois manteve-se um padrão gradual de aumento no conteúdo de ABA à medida que os dias sem água se mantiveram (GRÁFICO 3.6).

Gráfico 3.6 – Níveis endógenos de ABA em tecidos foliares do clone VM05 sob diferentes regimes hídricos.



Legenda: CT = plantas irrigadas; T1 = 1 dia de estresse; T2 = 2 dias de estresse; T3 = 3 dias de estresse; T4 = 4 dias de estresse; T5 = 5 dias de estresse; T6 = 6 dias de estresse; RS = 6 dias de estresse + 48 horas de irrigação.

Neste gráfico, observa-se que o nível endógeno de ABA nos tecidos foliares ao sexto dia de déficit hídrico (T6) foi 4x maior do que aquele observado em plantas que não passaram nenhum dia sob estresse (CT). Após as plantas serem reidratadas (RS), esses valores reduziram drasticamente, atingindo valores similares aos das plantas CT.

DISCUSSÃO

Carboidratos

O objetivo das quantificações de carboidratos em tecidos foliares foi entender como o déficit hídrico em diferentes níveis afetaria o acúmulo destes compostos em dois clones de eucalipto diferentes, uma vez que, em situações de redução da disponibilidade hídrica, ocorre também redução na assimilação de carbono pelas plantas. Esses compostos compreendem, predominantemente, amido, hexoses-fosfato e sacarose.

Durante o dia, em condições ótimas de desenvolvimento, a fotossíntese assimila o CO₂ atmosférico e produz trioses-fosfato, que podem ser utilizadas para a síntese de amido no cloroplasto ou podem ser exportadas para o citosol para a produção de sacarose (BURRI et al., 2014). O amido acumula-se quando a oferta de sacarose para os tecidos-dreno está acima do necessário e para atuar como substrato dos processos metabólicos à noite (THALMANN;

SANTELIA, 2017). A degradação noturna desse amido libera maltose e glicose, açúcares usados para manter o pool de hexoses-fosfato nas células e para a síntese de sacarose (WAI et al., 2019).

Além das variações em função do fotoperíodo, a distribuição dos carboidratos também é afetada em condições de déficit hídrico, uma vez que esses açúcares atuam na manutenção do equilíbrio osmótico das células (HASIDEBER et al., 2015). Além disso, essa distribuição também está sujeita a alterações na taxa de exportação dos compostos para fora dos tecidos-dreno (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Estudos em espécies arbóreas e lenhosas mostraram que o amido não acumula-se em folhas em condições de déficit hídrico, devido à uma provável translocação desse composto para as raízes, para recuperação de suas funções após o estresse ou para favorecer o crescimento de novas raízes que melhorariam o acesso das plantas à água do solo (HAGEDORN et al, 2016; THALMANN; SANTELIA; 2017; XU et al., 2015). Essa redução nas concentrações de amido foi observada nos dois clones de eucalipto avaliados, VM01 e VM05, apesar de não terem sido feitas avaliações radiculares, para confirmar esse padrão de distribuição.

Ao observar o Gráfico 3.1 é possível perceber que os teores de amido aumentam no clone VM01 do 1º dia até o 3º dia sem água e diminuem a partir do 4º dia de déficit hídrico. Provavelmente essa dinâmica ocorre pois antes do 4º dia sem água esse clone ainda não estava sentindo os efeitos negativos do estresse, ou estava sentindo em níveis muito baixos, que não prejudicavam o acúmulo de amido. Esses dados concordam com as variações na taxa fotossintética desse clone, onde a redução da fotossíntese começa a ocorrer a partir do 3º dia de estresse (dados não mostrados). O consumo do amido armazenado ou a redução da sua síntese nos tecidos foliares pode ser uma das respostas iniciais à seca, para manter o suprimento de carbono em condições de baixa fixação (KAKANI et al., 2011).

Em contrapartida, as concentrações de amido foliar no clone VM05 começam a reduzir no primeiro dia em que água foi suspensa e essa redução se manteve à medida que os dias sem água persistiram (GRÁFICO 3.1). Aparentemente, esse clone altera seu metabolismo de carbono até com as pequenas reduções na quantidade de água. Quanto às plantas do tratamento CT, que foram mantidas hidratadas, observa-se que os dois clones apresentam estratégias diferentes no acúmulo do amido. No Gráfico 3.1, também vemos que a quantidade de amido presente nas folhas do clone VM05 é superior à quantidade presente no clone VM01. Uma explicação para essa diferença é que o clone VM05 é considerado mais produtivo que o clone VM01 (BERENQUER et al., 2018), por isso ele pode ser capaz de acumular mais carbono, que posteriormente pode ser convertido em biomassa.

Ainda no mesmo gráfico é possível comparar também as diferenças na concentração de amido nas plantas que foram reidratadas (tratamento RS). No segundo dia de irrigação pós-estresse (tratamento RS), o clone VM01 quase dobra a quantidade de amido acumulado que havia aos seis dias sem água (tratamento T6), diferentemente do clone VM05, que mantém o amido em níveis similares às plantas que estavam sob estresse severo. Isso leva a hipótese de que este clone é mais sensível ao déficit hídrico que o clone VM01 pois as alterações no balanço de carboidratos são percebidas logo no início do estresse e a recuperação das plantas após o reestabelecimento da irrigação é mais lenta. Estudo com mutantes de β -amilase 1 (enzima que degrada amido) em *Arabidopsis* revelaram que essas plantas acumularam mais amido nas células-guarda, fato que reduziu a abertura estomática e melhorou a tolerância inicial dessas plantas ao estresse (PRASH et al., 2015).

A hipótese da maior sensibilidade do clone VM05 ao déficit hídrico é reforçada pelas variações nas concentrações de açúcares redutores (GRÁFICO 3.2). Plantas do clone VM01 variaram muito mais os níveis destes açúcares do que as plantas do clone VM05, fato que já era esperado devido às variações no conteúdo de amido. Como o amido é formado por várias moléculas de D-glicose muito longas, unidas por ligações glicosídicas, sua reserva de carbono não está imediatamente disponível para as plantas (ZARGAR et al., 2017). Ele é disponibilizado apenas após a ação das enzimas de degradação, que têm suas atividades aceleradas em condições de estresse (ZANELLA et al., 2016). Isso porque os açúcares liberados nessa degradação atuam como osmoprotetores, ou seja, solutos que tentam mitigar os efeitos negativos da falta de água, como sinalizadores para componentes de cascatas de resposta ao estresse ou como substrato para a via das pentoses-fosfato, que contribui para a eliminação das espécies reativas de oxigênio formadas em condições de estresse (HASIDEBER et al., 2015; LAXA et al., 2019; THALMANN; SANTELIA, 2017). Estudos em tecidos lenhosos sugerem que esses açúcares são mais acumulados em resposta ao déficit hídrico nessas espécies, pois têm baixo peso molecular para a regulação osmótica, além de estarem relacionados com reduções no crescimento causado pelo falta de água (GRANDA; CAMARERO, 2017; MERCHANT et al., 2007; PIPER; FAJARDO; HOCH, 2017; SALA; WOODRUFF; MEINZER, 2012).

Observando o Gráfico 3.2 é possível perceber que o ajuste osmótico, via açúcares não redutores, em plantas do clone VM01 começa no quarto dia de estresse, enquanto que nas plantas do clone VM05, começa ao terceiro dia de estresse. Essas variações também podem derivar da diminuição da demanda de açúcares nas plantas que estavam sob estresse mais severo. Como a disponibilidade de água estava baixa, o crescimento, sustentado pelos

carboidratos, foi limitado e esses açúcares passaram a se acumular nas células dos tecidos foliares. Isso demonstra que esses compostos desempenham múltiplas funções, ativadas de acordo com a necessidade das plantas e que essas modulações, tanto na concentração dos compostos quanto nos diferentes clones, são fundamentais para o entendimento do metabolismo das plantas em diferentes condições. Respostas variadas são a chave para elucidar os mecanismos de tolerância desenvolvidos por algumas plantas (BARTLETT et al., 2016; CHOAT et al., 2018).

O último carboidrato quantificado, a sacarose, foi o que menos sofreu variação entre os dois clones. Esse comportamento também já foi observado em plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico (SALES et al., 2012). Nas folhas, a sacarose pode ser sintetizada a partir de açúcares provenientes da degradação do amido, sendo transportada, via floema, para outras áreas metabolicamente ativas (drenos) (XU et al., 2015). O aumento na concentração desse composto ocorreu nos tratamentos T3 e T4, para os clones VM01 e VM05 respectivamente (GRÁFICO 3.3). Assim como para os demais açúcares quantificados, esses tratamentos são os que revelaram maiores discrepâncias entre os dois materiais vegetais. No clone VM01, o aumento da sacarose no T4 coincidiu com o aumento de açúcares redutores, assim como aconteceu com o clone VM05, mas um dia antes, no tratamento T3. Após esses tratamentos, a concentração de sacarose aumentou nos dois clones, em resposta à diminuição do conteúdo de água. Provavelmente esse açúcar ficou retido nas folhas e não conseguiu ser exportado para os tecidos vasculares, devido à baixa quantidade de água presente nos vasos condutores. Alguns estudos relatam que a concentração da sacarose em situações de déficit hídrico está relacionada com uma maior tolerância ao estresse, pois ela atua como estabilizante de proteínas e membranas e na sinalização de espécies reativas de oxigênio (BIE et al., 2012; HE et al., 2015; TAMURA et al., 2014). Com o reestabelecimento do suprimento de água no tratamento RS a sacarose voltou a ser transportada e seus níveis não diminuíram, quando comparados com os tratamentos anteriores, pois as plantas voltaram a sintetizar sacarose a partir dos produtos gerados na fotossíntese.

A distribuição geral dos carboidratos nas folhas em função do conteúdo de água pode ser entendida de forma mais clara na Figura 3.1. Plantas VM05 que não passaram por escassez de água continham mais amido e açúcares redutores nas células foliares que plantas VM01, mas ao primeiro dia sem reposição da água absorvida, essas plantas já tinham quantidades de amido similares. À medida que avançavam sob déficit hídrico, plantas VM01 acumularam amido e plantas VM05 acumularam açúcares redutores, até o terceiro dia sem irrigação. Foi nesse ponto que, provavelmente, o transporte de água começou a ser afetado e que o estresse começou a

prejudicar outros processos celulares. A partir daí, plantas VM05 começaram a apresentar sinais de estresse mais severo, tanto fenotípicos quanto metabólicos. No último dia de estresse, mesmo com baixa quantidade de amido nos cloroplastos, plantas VM01 tinham menos solutos dispersos no citosol e apresentavam as folhas menos murchas que plantas VM05. É provável também que os níveis baixos de sacarose em todos os tratamentos, mesmo quando havia alta disponibilidade de hexoses, seja em decorrência do horário da coleta dos tecidos foliares. O material foi coletado no início da noite, quando as hexoses liberadas pela degradação noturna do amido ainda estavam no citosol. Provavelmente, ainda não havia começado a síntese de sacarose ou ela estava ocorrendo em taxas muito baixas, até mesmo pela baixa demanda desse composto em condições de déficit hídrico. Altas concentrações de soluto necessárias para o ajuste osmótico durante a baixa disponibilidade de água, se acumuladas com açúcares solúveis, podem aumentar a viscosidade da seiva do floema e potencialmente bloquear o transporte do floema (MERCHANT et al., 2010; SAVAGE et al., 2016).

Tudo isso sugere que a distribuição de carboidratos é influenciada e afeta diversos processos em condições de déficit hídrico. De modo geral, esse estudo em eucalipto mostrou um panorama mais amplo da dinâmica de carboidratos nos materiais avaliados e levantou hipóteses sobre a influência deles na tolerância ao déficit hídrico. Estudos futuros podem avaliar também outros materiais genéticos e outros processos metabólicos, como a atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de amido e sacarose (amilase, sacarose sintase e invertase), a produção de outros compostos com função osmorreguladora (como prolina) e a distribuição de carboidratos e outros metabólitos ao longo da planta (como caules e raízes). Com isso, espera-se encontrar padrões que levem a determinar o que influencia as diferentes respostas metabólicas ao déficit hídrico em eucalipto.

Ácido abscísico

Além dos carboidratos, outro composto atua como sinal metabólico em plantas sob de déficit hídrico, o ABA. Dentro das células, o ABA induz o acúmulo de protetores, como pequenas proteínas hidrofílicas, açúcares e prolina (FINKELSTEIN, 2013). Modulações na biossíntese e distribuição desse hormônio nas folhas têm impacto direto na abertura estomática e na regulação transcricional de vários genes associados às respostas vegetais (PINHEIRO; CHAVES, 2011; SAH; REDDY; LI, 2016, 2016; YOSHIDA et al., 2010; ZHU, 2002). Entre as respostas mais rápidas associadas a este composto estão as mudanças na abertura estomática (OLLAS; DODD, 2016). À medida que o déficit hídrico torna-se mais severo, as plantas

reduzem a abertura dos poros estomáticos, a fim de evitar a perda de água e manter o funcionamento celular (SPOKEVICIUS et al., 2017). Em consequência dessa redução, os valores de condutância estomática (g_s) diminuem (BRUNETTI et al., 2019; ZANDALINAS et al., 2018).

Os processos de abertura e fechamento estomático são regulados pela pressão de turgescência celular, parâmetro que é mediado pelo fluxo de íons em canais associados à membrana das células-guarda (TAIZ et al., 2017). Em condições de baixa disponibilidade de água, o ABA funciona como um mensageiro químico, capaz de ativar esses canais iônicos que induzirão o fechamento estomático, via proteínas quinases e fosfatases, espécies reativas de oxigênio ou cátions, como o Ca^{2+} (LIM et al., 2015). Com o reconhecimento do estresse pelas plantas, ocorre ativação da(s) via(s) de transdução de sinal, as células passam a emitir respostas àquela condição, como redução do potencial hídrico (GRÁFICO 1.1 – Artigo 1), diminuição da pressão de turgescência e redução da condutância estomática. Essas alterações ocorrem tanto em níveis bioquímicos como moleculares (BRAY, 2002).

Essa dinâmica nos valores de g_s foi observada para os dois clones avaliados (GRÁFICO 3.4), onde os valores da condutância diminuíram, à medida que os dias sem água persistiram, e aumentaram em resposta à reidratação (RS). Alterações nesse parâmetro acentuaram ainda mais as diferenças entre os clones, fato já observado nos dados anteriores. Plantas do clone VM05 que não passaram pelo déficit hídrico (CT) mantiveram os estômatos mais abertos que plantas do clone VM01 nas mesmas condições. Entretanto, entre o terceiro (T3) e quarto dia sem água (T4), as plantas VM01 fecharam os estômatos rapidamente; enquanto as plantas VM05 não apresentaram esse comportamento, uma vez que seus valores de g_s diminuíram mais lentamente, sem quedas acentuadas entre os tratamentos. Isso sugere que as plantas VM01 fecham os estômatos de maneira mais rápida em condições estressantes.

Essa hipótese é reforçada quando comparamos os Gráficos 3.5 e 3.6, que mostram os níveis endógenos de ABA nos dois clones. O conteúdo de ABA aumenta drasticamente no clone VM01 ao quarto dia de déficit hídrico (T4), enquanto que no clone VM05, esse comportamento só é observado ao sexto dia de estresse (T6). Fatores como anatomia dos estômatos e espessura do mesofilo também influenciam os valores de g_s , especialmente em condições de baixa disponibilidade de água (FRANKS; BEERLING, 2009). Cultivares de arroz com diferentes capacidades de tolerância ao déficit hídrico também apresentaram valores diferentes de g_s , em função da densidade estomática e do tamanho dos estômatos (estômatos menores foram mais responsivos ao estresse) (OUYANG et al., 2017).

Em comparação com as variações na condutância obtidas para os clones VM01 e VM05, pode-se inferir que estes materiais apresentam diferentes níveis de tolerância ao déficit hídrico e que um dos mecanismos adotados por essas plantas para sobreviver em ambientes mais secos pode estar envolvido com as características dos estômatos. Essa ideia é apoiada ainda pelas características foliares do clone VM05, que apresenta folhas sem cerosidade, o que facilita o processo de perda de água (MAPA, 2017), além dos valores de ABA endógeno.

As diferenças na g_s dos clones também foram observadas nas plantas que foram reidratadas (RS). Plantas VM05 abriram os estômatos mais rapidamente que plantas VM01, mesmo tendo sido reidratadas com a mesma quantidade de água e pelo mesmo período de tempo. Esse comportamento ocorre mesmo com as plantas VM05 estando visivelmente mais murchas que as VM01, o que indica uma maior susceptibilidade desse clone às variações no conteúdo de água.

Concomitantemente, maior tolerância ao déficit hídrico é associada à maiores níveis de ABA nas folhas nestas condições (BASU et al., 2016; VERMA; RAVINDRAN; KUMAR, 2016; YOSHIDA et al., 2010; ZHANG et al., 2008). Isso porque, o ABA altera o transporte de íons nas células-guarda, promovendo o fechamento estomático e a redução da perda de água (DEJONGHE; OKAMOTO; CUTLER, 2018). Esse padrão foi observado nas plantas do clone VM01, onde a queda mais acentuada nos valores da g_s ocorrem no mesmo ponto onde houve maior acúmulo de ABA nas folhas (T4) (GRÁFICO 3.4 e 3.5). Nas plantas do clone VM05, a redução da g_s ocorreu de maneira mais lenta entre os tratamentos, se igualando em valores com o clone VM01 apenas no T6, ponto onde os seus valores de ABA também foram mais altos (GRÁFICO 3.6).

As variações no conteúdo de ABA observadas no clone VM01, podem sugerir que esse clone apresenta uma maior regulação deste composto nas folhas, uma vez que os conteúdos de ABA nos tecidos estão sujeitos à degradação quando atingem valores muito altos, para garantir a homeostase (MATILLA; CARRILO-BARRAL; RODRÍGUEZ-GACIO, 2015). Além disso, variações na concentração de ABA estão associados a modulação de vários genes envolvidos nas respostas de tolerância ao déficit hídrico (FUJITA et al., 2011). Os resultados sugerem que ocorreu uma maior síntese de ABA nas folhas do clone VM01, antecipada em relação ao VM05, o que pode ser uma explicação para a maior tolerância desse genótipo ao déficit hídrico. Essas ideias podem ser confirmadas em estudos futuros, através da quantificação do ABA em raízes e caules, para ver como ocorre a distribuição deste composto em situações estressantes.

CONCLUSÃO

Os materiais genéticos dos dois clones apresentaram respostas distintas em relação ao déficit hídrico, quanto ao metabolismo de carboidratos e de ABA. De modo geral, os clones VM01 e VM05 foram responsivos à progressão do déficit hídrico imposto, sendo que ambos parecem ter algum grau de tolerância à este estresse, mas em níveis diferentes e usando estratégias diferentes.

O clone VM01 apresentou mais características associadas à tolerância ao déficit hídrico que o clone VM05, como maior regulação na distribuição de carboidratos e acúmulo antecipado de ABA sob estresse. Esse acúmulo pode ter influenciado o fechamento mais rápido dos seus estômatos, garantindo menor perda de água pelas plantas VM01.

O clone VM05 aparentou sentir os efeitos negativos do déficit hídrico primeiro, entretanto apresentou respostas de defesa mais tardias, o que pode ter contribuído para seu aspecto mais debilitado frente à falta de água. Além disso, em condições de estabelecimento da irrigação, este clone mostrou respostas que podem ter prejudicado sua recuperação, como abertura antecipada dos estômatos.

Este estudo, de espécies que apresentam respostas contrastantes frente ao estresse, mas que possuem características comuns no seu genótipo, ajudou a identificar alguns fatores que podem controlar os mecanismos de tolerância. Os resultados permitem inferir que, para as plantas avaliadas, a dinâmica de carboidratos e de ABA está sob controle genético, além do controle ambiental. Estudos desse tipo não são comuns em espécies florestais, mas são cruciais para melhorar o rendimento da produção frente as adversidades ambientais.

REFERÊNCIAS

- BARTLETT, M. K. et al. The correlations and sequence of plant stomatal, hydraulic, and wilting responses to drought. **PNAS**, v. 113, n. 46, p. 13098-13103, 2016.
- BASU, S. et al. Plant adaptation to drought stress. **F1000 Research**, v. 5, n. 1554, p. 1-10, 2016.
- BERENGUER, H. D. P. et al. Differential physiological performance of two *Eucalyptus* species and one hybrid under different imposed water availability scenarios. **Trees**, n. 32, p. 415-427, 2018.
- BIE, X. et al. Combinational transformation of three wheat genes encoding fructan biosynthesis enzymes confers increased fructan content and tolerance to abiotic stresses in tobacco. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 2229-2238, 2012.

- BRAY, E. A. Abscisic acid regulation of gene expression during water deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 153-161, 2002.
- BRUNETTI, C. et al. Dynamic changes in ABA content in water-stressed *Populus nigra*: effects on carbon fixation and soluble carbohydrates. **Annals of Botany**, p. 1-17, 2019.
- BURRI, S. et al. The impact of extreme summer drought on the short-term carbon coupling of photosynthesis to soil CO₂ efflux in a temperate grassland. **Biogeosciences**, v. 11, p. 961-975, 2014.
- CHOAT, B. et al. Triggers of tree mortality under drought. **Nature**, v. 558, p. 531-540, 2018.
- DASGUPTA, M. G.; DHARANISHARANTHI, V. Identification of PEG-induced water stress responsive transcripts using co-expression network in *Eucalyptus grandis*. **Gene**, v. 267, p. 393-407, 2017.
- DASZKOWSKA-GOLEC, A.; SZAREJKO, I. The Molecular Basis of ABA-Mediated Plant Response to Drought. In: VAHDATI, K.; LESLIE, C. (Eds.). **Abiotic Stress - Plant Responses an Applications in Agriculture**. Croatia: Intechopen, 2013, p. 103-133. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/45842>>. Acesso em: 29 jun. 2019.
- DEJONGHE, W.; OKAMOTO, M.; CUTLER, S. R. Small Molecule Probes of ABA Biosynthesis and Signaling. **Plant and Cell Physiology**, v.59, n. 8, p. 1-10, 2018.
- DURGBANSHI, A. et al. Simultaneous Determination of Multiple Phytohormones in Plant Extracts by Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8437–8442, 2005.
- FINKELSTEIN, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. **The Arabidopsis Book**, v. 11, p.1-52, 2013.
- FRANKS, P. J.; BEERLING, D. J. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. **PNAS**, v. 106, n. 25, p. 10343-10347, 2009.
- FUJITA, Y. et al. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, p. 509-525, 2011.
- GRANDA, E.; CAMARERO, J. J. Drought reduces growth and stimulates sugar accumulation: new evidence of environmentally driven non-structural carbohydrate use. **Tree Physiology**, n. 37, p. 997-1000, 2017.
- HAGEDORN, F. et al. Recovery of trees from drought depends on belowground sink control. **Nature Plants**, v. 2, n. 16111, p. 1-5, 2016.
- HANDEL, E. V. Direct Microdetermination of Sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 22, p. 280-283, 1968.
- HARTMANN, H.; TRUMBORE, S. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. **New Phytologist**, v. 211, p. 386-403, 2016.
- HASIDEBER, R. et al. Summer drought alters carbon allocation to roots and root respiration in mountain grassland. **New Phytologist**, v.205, n. 3, p. 1117-1127, 2015.
- HE, X. et al. A sucrose: fructan-6-fructosyltransferase (*6-STF*) gene from *Psathyrostachys huashanica* confers abiotic stress tolerance in tobacco. **Gene**, v. 570, p. 239-247, 2015.

HODECKER, B. E. R. et al. Water availability preceding long-term drought defines the tolerance of *Eucalyptus* to water restriction. **New Forests**, v. 49, p. 173-195, 2018.

INGRISCH, J. et al. Land Use Alters the Drought Responses of Productivity and CO₂ Fluxes in Mountain Grassland. **Ecosystems**, v. 21, n. 4, p. 689-703, 2018.

KAKANI, V. G. et al. Leaf photosynthesis and carbohydrates of CO₂-enriched maize and grain sorghum exposed to a short period of soil water deficit during vegetative development. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 2169-2176, 2011.

KALLADAN, R. et al. Natural Variation in 9-Cis-Epoxycartenoid Dioxygenase 3 and ABA Accumulation. **Plant Physiology**, v. 179, p. 1620-1631, 2019.

KARLOWSKY, S. et al. Drought-Induced Accumulation of Root Exudates Supports Post-drought Recovery of Microbes in Mountain Grassland. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1593, p. 1-16, 2018.

LAXA, M. et al. The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. **Antioxidants**, v. 8, n. 94, p. 1-31, 2019.

LIM, C. W. et al. Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 15251-15270, 2015.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2017. **Descrições de cultivares de eucalipto**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protecao-de-cultivar/publicacoes/descricoes-de-cultivares-de-eucal.ipto.xls/view>>. Acesso em: 04 julho 2019.

MATILLA, A. J.; CARRILO-BARRAL, N.; RODRÍGUEZ-GACIO, M. del C. An Update on the Role of *NCED* and *CYP707A* ABA Metabolism Genes in Seed Dormancy Induction and the Response to After-Ripening and Nitrate. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 274-293, 2015.

MERCHANT, A. et al. Contrasting Physiological Responses of Six *Eucalyptus* Species to Water Deficit. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1507-1515, 2007.

MERCHANT, A. et al. Phloem sap and leaf $\delta^{13}\text{C}$, carbohydrates, and amino acid concentrations in *Eucalyptus globulus* change systematically according to flooding and water deficit treatment. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 6, p. 1785-1793, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NOLAN, R. H. et al. Differences in osmotic adjustment, foliar abscisic acid dynamics, and stomatal regulation between an isohydric and anisohydric wood angiosperm during drought. **Plant, Cell and Environment**, v. 40, p. 3122-3134, 2017.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2019. **Air and GHG emissions (indicator)**. Disponível em: <<https://data.oecd.org/air/air-and-ghg-emissions.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

OLLAS, C. de.; DODD, I. C. Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. **Plant Molecular Biology**, v. 91, p. 641-650, 2016.

- OUYANG, W. et al. Stomatal conductance, mesophyll conductance, and transpiration efficiency in relation to leaf anatomy in rice and wheat genotypes under drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 18, p. 5191-5205, 2017.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 869-882, 2011.
- PIPER, F. I.; FAJARDO, A.; HOCH, G. Single-provenance mature conifers show high non-structural carbohydrate storage and reduced growth in arid location. **Tree Physiology**, v. 37, p. 1001-1010, 2017.
- PRASH, C. M. β -amylase1 mutant *Arabidopsis* plants show improved drought tolerance due to reduced starch breakdown in guard cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 19, p. 6059-6067, 2015.
- RAMAKRISHNA, A.; GILL, S. S. (Eds) **Metabolic Adaptations in Plants During Abiotic Stress**. Boca Raton: CRC Press, 1 ed., 2018. 442 p.
- ROY, J. et al. Elevated CO₂ maintains grassland net carbon uptake under a future heat and drought extreme. **PNAS**, v. 113, n. 22, p. 6224-6229, 2016.
- SAH, S. R.; REDDY, K. R. LI, J. Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 571, p. 1-26, 2016.
- SALA, A.; WOODRUFF, D. R.; MEINZER, F. C. Carbon dynamics in trees: feast or famine? **Tree Physiology**, v. 32, p. 764-775, 2012.
- SALES, C. R. G. et al. Trocas gasosas e balanço de carboidratos em plantas de cana-de-açúcar sob condições de estresses radiculares. **Bragantia**, v. 71, n. 3, p. 319-327, 2012.
- SANTOS, A. A. dos. et al. Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 1-9, 2017.
- SAVAGE, J. A. et al. Allocation, stress tolerance and carbon transport in plants: how does phloem physiology affect plant ecology? **Plant, Cell and Environment**, v. 39, p. 709-725, 2016.
- SPOKEVICIUS, A. V. et al. Medium term water deficit elicits distinct transcriptome responses in Eucalyptus species of contrasting environmental origin. **BMC Genomics**, v. 18, n. 284, p. 1-17, 2017.
- TAIZ, L. et al. (Eds.); [MASTROBERTI, A. A. et al. (trad.)] **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed., 2017, 888 p.
- TAMURA, K. et al. Comparative study of transgenic *Brachypodium distachyon* expressing sucrose: fructan 6-fructosyltransferases from wheat and timothy grass with different enzymatic properties. **Planta**, v. 239, p. 783-792, 2014.
- THALMANN, M. et al. Regulation of Leaf Starch Degradation by Abscisic Acid Is Important for Osmotic Stress Tolerance in Plants. **The Plant Cell**, v. 28, p. 1860-1878, 2016.
- THALMANN, M.; SANTELIA, D. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, v. 214, p. 943-951, 2017.

- VALDÉS, A. E. et al. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 79, p. 263-276, 2013.
- VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P. P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 86, p. 1-10, 2016. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 86, p. 1-21, 2016.
- WAI, C. M. et al. Time of day and network reprogramming during drought induced CAM photosynthesis in *Sedum album*. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 6, p. 1-31, 2019.
- WANI, S. H. et al. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **The Crop Journal**, v. 4, p. 162-176, 2016.
- XU, W. et al. Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 9, p. 1-11, 2015.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.
- YOSHIDA, T. et al. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. **The Plant Journal**, v. 61, p. 672-685, 2010.
- ZANDALINAS, S. I. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 162, p. 2-12, 2018.
- ZANELLA, M. et al. β -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 6, p. 1819-1826, 2016.
- ZARGAR, S. M. et al. Impact of drought on photosynthesis: Molecular perspective. **Plant Gene**, v. 11, p. 154-159, 2017.
- ZHANG, Y. et al. Overexpressing *SgNCED1* in Tobacco Increases ABA Level, Antioxidant Enzyme Activities, and Stress Tolerance. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 27, p. 151-158, 2008.
- ZHU, J.-K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. **Cell**, v. 167, p. 313, 325, 2016.
- ZHU, J.-K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.